

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Etablierung eines *in vitro* Tumorprogressionsmodells für
humane epitheliale Zellen durch Einbringen definierter
genetischer Elemente**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Antje Repenning
aus Ueckermünde

April 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Esche

2. Gutachter: PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2009

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungen.....	VII
1.	Einleitung	1
1.1.	Biologie und Pathologie humaner Papillomviren.....	1
1.1.1.	Molekularer Aufbau humaner Papillomviren.....	1
1.1.2.	Funktion der viralen Proteine.....	1
1.1.3.	Der virale Replikationszyklus	3
1.1.4.	HPV-assoziierte Erkrankungen	3
1.1.5.	Rolle von E6 und E7 hochonkogener HPV-Typen bei der Entstehung zervikaler Tumore.....	5
1.2.	<i>In vitro</i> Tumorprogressionsmodelle.....	8
1.2.1.	Definierte genetische Elemente als Basis für <i>in vitro</i> Tumorprogressionsmodelle.....	8
1.2.2.	hTERT und Telomerase	9
1.2.3.	Rb.....	12
1.2.4.	p53.....	12
1.2.5.	H-Ras	13
1.2.6.	PP2A	14
1.3.	Ziel der Arbeit	15
2.	Material	17
2.1.	Chemikalien	17
2.2.	Puffer und Lösungen.....	18
2.3.	Nährmedien.....	21

2.4.	Enzyme	21
2.5.	Antikörper.....	21
2.5.1.	Primär-Antikörper (monoklonale IgG-AK)	21
2.5.2.	Primär-Antikörper (polyklonale IgG-AK für IHC)	22
2.5.3.	Sekundär-Antikörper (polyklonale Peroxidase-konjugierte IgG-AK)	22
2.6.	Molekulargewichtsstandards	22
2.7.	Oligonukleotide.....	23
2.8.	Plasmide	24
2.9.	Kits und spezielle Reagenzien	25
2.10.	Bakterienstämme.....	25
2.11.	Zelllinien.....	25
2.11.1.	Erworbene primäre Zellen bzw. Zelllinien	25
2.11.2.	Hergestellte Zelllinien	27
2.12.	Versuchstiere	29
2.13.	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur.....	29
2.14.	Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien.....	30
2.15.	Spezielle Laborgeräte.....	30
3.	Methoden	31
3.1.	Allgemeine Methoden	31
3.2.	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	31
3.2.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Mullis, <i>et al.</i> , 1986)	31
3.2.2.	Reverse Transkriptase – PCR (RT-PCR)	32
3.2.3.	Bestimmung von Genexpressionsprofilen mittels Mikroarray	32
3.2.4.	Quantifizierung der mRNA Expression mittels Taqman Real Time RT-PCR	33
3.2.5.	Karyotypanalyse humaner Zellen (GTG-Färbung).....	33
3.3.	Analyse von Proteinen	34
3.3.1.	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus humanen Zellen	34

3.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.3.3.	Western Blot	35
3.4.	Bestimmung der Telomerase-Aktivität	35
3.5.	Zellkultur	36
3.5.1.	Kultivierung humaner Zellen <i>in vitro</i>	36
3.5.2.	Bestimmung des <i>in vitro</i> Wachstumsverhaltens von humanen Zellen	37
3.5.3.	Herstellung stabiler humaner Zelllinien mittels retroviraler Infektion.....	37
3.5.3.1.	HFK-LXSN/K-LXSN und K-E6/E7	38
3.5.3.2.	HFK-E6/E7-Puro.....	39
3.5.3.3.	HFK-E6/E7-Ras, K-E6/E7-Puro, K-E6/E7-Ras	39
3.5.3.4.	HFK-E6/E7-Ras-Zeo	40
3.5.3.5.	K-E6/E7-Ras-Zeo#2.2, K-E6/E7-Ras-st#1.4, K-E6/E7-Ras-stm#4.2, HFK-E6/E7-Ras-st#7.2, HFK-E6/E7-Ras-st#7.5, HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4 und HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4,	40
3.5.3.6.	NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4, NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 und NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.4	41
3.6.	Tumorigenitätsassays.....	41
3.6.1.	Softagarassay/Kolonieformationsassay	41
3.6.2.	Test auf Tumorigenität durch Injektion in immundefiziente Mäuse.....	42
3.7.	Histologische Untersuchungen	42
3.7.1.	Herstellung von Paraffinschnitten	42
3.7.2.	HE-Färbung von Gewebeschnitten und adhärenen Zellen.....	43
3.7.3.	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.....	43
4.	Ergebnisse.....	45
4.1.	Charakterisierung HPV16 E6-, E7 und E6/E7-positiver humaner Vorhautkeratinozyten: Überprüfung von immortalen bzw. tumorigenen Eigenschaften nach Langzeitkultivierung unter <i>in vitro</i> Bedingungen	45

4.1.1.	Verifizierung der Expression der viralen Gene in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 nach Langzeitkultivierung unter <i>in vitro</i> Bedingungen	45
4.1.2.	Analyse der Expression von hTERT und der Telomerase-Aktivität in HPV16 E6-, E7-, und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten	47
4.1.3.	Ermittlung chromosomaler Veränderungen in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten	48
4.1.4.	<i>In vitro</i> Wachstum langzeitkultivierter, HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-exprimierender humaner Vorhautkeratinozyten.....	50
4.1.5.	<i>In vivo</i> Wachstum von HPV16-E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten nach Langzeitkultivierung unter <i>in vitro</i> Bedingungen	51
4.2.	Analyse der differentiellen Genexpression von HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven, immortalen humanen Keratinozyten	52
4.2.1.	Erstellung eines Genexpressionsprofils von HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten mit Hilfe von Mikroarrays	53
4.2.2.	Verifizierung der veränderten Expression ausgesuchter Gene durch quantitative Real Time RT-PCR	65
4.2.3.	Analyse der Proteinexpression ausgewählter differentiell exprimierter Gene in E6-, E7- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten mittels Western blot	68
4.2.4.	Eignung von in HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten differentiell exprimierten Genen als diagnostische Marker für CIN-Läsionen	69
4.3.	Etablierung tumorigener humaner Epithelzellen unter <i>in vitro</i> Bedingungen durch Expression definierter genetischer Elemente	70
4.3.1.	Experimentelle Strategie.....	70
4.3.2.	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie HFK-E6/E7-Ras	71
4.3.3.	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie HFK-E6/E7-Ras-st.....	76
4.3.4.	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien K-E6/E7-Ras und K-E6/E7-Ras-st	78
4.3.5.	Charakterisierung der Zelllinien NHBE-hT-LT und NHBE-hT-LT-Ras	87
4.3.6.	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st.....	90

4.3.7.	Bedeutung von CIP2A für die maligne Transformation humaner Epithelzellen	93
5.	Diskussion.....	98
5.1.	Die Expression von HPV16 E6 und/oder E7 führt in humanen Vorhautkeratinozyten unter <i>in vitro</i> Langzeitkultivierungs-bedingungen zu einem immortalen Phänotyp, einem veränderten Karyotyp, jedoch nicht zu einer malignen Transformation	99
5.2.	In HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten differenziell exprimierte zelluläre Gene könnten als neue Markergene für differenzialdiagnostische Analysen zervikaler Gewebeschnitte eingesetzt werden.....	101
5.2.1.	In HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Keratinozyten werden überwiegend Gene differenziell exprimiert, deren Produkte einen Einfluss auf Zellzykluskontrolle, zelluläre Entwicklung und Differenzierung, Immunantwort, Apoptose, Zell-Zell-Kommunikation, Antwort auf DNA-Schäden und Angiogenese haben	101
5.2.2.	Eine quantitative Real-Time-RT-PCR-Analyse bestätigt eine differenzielle Expression für verschiedene zelluläre Gene, u.a. <i>LDOC1</i> , <i>REG</i> , <i>DCN</i> und <i>WNT4</i>	104
5.2.3.	Wnt4, REG, Decorin, WT1 und Thrombospondin-2 stellen potenziell neue Marker für HPV-assoziierte Transformationsprozesse dar	108
5.3.	Die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras reicht nicht aus, um in humanen Vorhautkeratinozyten einen vollständig ausgeprägten tumorigenen Phänotyp zu induzieren	109
5.4.	Die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7, H-Ras und SV40 st resultiert in humanen Vorhautkeratinozyten in einem Überlebensnachteil	112
5.5.	Die kombinierte Expression von hTERT, SV40 LT, H-Ras und SV40 st induziert in humanen Bronchialepithelzellen die Fähigkeit zur Koloniebildung in Softagar sowie zur Tumorbildung in Nacktmäusen.....	114
5.6.	CIP2A, ein zellulärer Inhibitor der Proteinphosphatase 2A, wird in immortalisierten und tumorigenen humanen Bronchialepithelzellen im	

	Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelzellen differenziell exprimiert.....	115
5.7.	Bewertung von <i>in vitro</i> Modellen zur Etablierung maligne transformierter humaner Zellen.....	117
6.	Zusammenfassung und Ausblick	119
7.	Literaturverzeichnis	122
8.	Publikationen	139
9.	Lebenslauf	140
10.	Erklärungen	141

II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum (destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
ALT	alternative telomere lengthening (Alternative Telomerverlängerung)
α -MEM	minimal essential medium α (minimal-essentielles Medium α)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BEGM	broncheal epithelial (cells) growth medium (Lungenepithelzell-Wachstumsmedium)
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonsäure
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Strukturmotiv
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bp	basepairs (Basenpaare)
CDK	cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor)
CR-HD	conserved region – homology domain (Konservierte Region – Homologie-Domäne)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	epidermal-mesenchymaler Übergang (epidermal-mesenchymal transition)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
HBSS	Hank's buffered salt solution (Hank's gepufferte Salzlösung)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenepithelzellen)

HFK	human foreskin keratinocytes (humane Vorhautkeratinozyten)
HPV	humanes Papillomvirus
hygro	Hygromycin
K-SFM	keratinocyte serum-free medium (Serum-freies Medium für Keratinozyten)
IHC	Immunhistochemie
LB	Luria-Bertani = Luria-Broth = Lysogeny-Broth
LOH	loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
LT	Large T (Antigen)
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
neo	Neomycin
NHBE	normal bronchial epithelial cells (normale Bronchialepithelzellen)
nt	nucleotides (Nukleotide)
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PD	population doublings (Populationsverdopplungen)
PDcum	cumulative population doublings (kumulative Populationsverdopplungen)
PDpp	population doublings per passage (Populationsverdopplungen pro Passage)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PP2A	Proteinphosphatase 2A
puro	Puromycin
Pyr	Natriumpyruvat
Rb	Retinoblastoma
RT	Reverse Transkription/Reverse Transkriptase
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
st	small t (Antigen)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TNS	trypsin neutralisation solution (Trypsin-Neutralisierungslösung)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
U	Unit (Maßeinheit für enzymatische Aktivität; 1 U = 1 mol/min)
UV	ultraviolett
zeo	Zeocin

Benutzte Vorsätze für Maßeinheiten und ihre mathematische Bedeutung

k	kilo	10^3
c	centi	10^{-2}
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	piko	10^{-12}

1. Einleitung

1.1. Biologie und Pathologie humaner Papillomviren

1.1.1. Molekularer Aufbau humaner Papillomviren

Eine zusammenfassende Beschreibung der genomischen Struktur humaner Papillomviren und Erläuterungen zur Funktion der viralen Proteine (s. nachfolgendes Kapitel) finden sich in einem Übersichtsartikel von Scheffner *et al.*, 1994.

Humane Papillomviren (HPV) sind 55 nm große ikosaedrische Viruspartikel ohne Membranhülle. Ihr Capsid besteht aus 72 pentameren Capsomeren und ist aus zwei Proteinen, L1 und L2, aufgebaut. Sie besitzen ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 8 kb Länge. Es kann in zwei Bereiche eingeteilt werden: eine Region, in der die früh in der viralen Replikation transkribierten Gene E1, E2, E4, E5, E6 und E7 zu finden sind (E = early) sowie ein Bereich, welcher für die spät im viralen Replikationszyklus exprimierten Gene L1 und L2 kodiert (L = late). Beide Regionen werden durch eine ca. 1000 bp umfassende *Long Control Region* (LCR), auch *Upstream Regulatory Region* (URR) genannt, getrennt, in der der Replikationsursprung und wichtige regulatorische Sequenzen liegen. Alle Gene werden von demselben Strang abgelesen, wobei die offenen Leserahmen (ORFs) überlappend angeordnet sind. Darüber hinaus finden sich über das gesamte Genom verteilt diverse Spleißdonor- und -akzeptorstellen. **Abb. 1** zeigt eine schematische Darstellung des Genoms von HPV16.

1.1.2. Funktion der viralen Proteine

Der E1-Leserahmen kodiert für phosphorylierte Proteine mit Helikasefunktion, die je nach Virustyp ein Molekulargewicht von 68-85 kDa aufweisen. Sie interagieren als Hexamere mit zellulären Proteinen wie der DNA-Polymerase- α oder der Primase und gewährleisten so die Replikation des viralen Genoms.

Der ORF für E2 kodiert für mehrere Polypeptide, die als Dimere wirken und u. a. die Bindung von E1 an den Replikationsursprung vermitteln und stabilisieren. Des Weiteren sind sie an der Transkriptionsregulation der Gene E6 und E7 beteiligt.

Die Funktion des E5-Proteins ist bis heute nicht genau geklärt. In *in vitro* Versuchen ist gezeigt worden, dass das E5-Protein von HPV16 proliferationsinduzierende Eigenschaften

hat, die möglicherweise durch Interaktion mit dem EGF-Rezeptor vermittelt werden (Pim *et al.*, 1992, Straight *et al.*, 1993, Bouvard *et al.*, 1994). Mikroarray-Analysen von HPV16 E5 – positiven immortalen Keratinozyten ergaben zudem eine differenzielle Expression von Genen, die für Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit verantwortlich sind (Kivi *et al.*, 2008).

Die Proteine, die von den E6- und E7-Leserahmen kodiert werden, haben ein Molekulargewicht von ca. 10-16 kDa, sind zum größten Anteil im Zellkern lokalisiert und binden dort an zahlreiche zelluläre Faktoren, wodurch u. a. der Zellzyklus, die Immunantwort und der Apoptosemechanismus moduliert werden. Dies erlaubt eine produktive Replikation des Virus. Im Falle der hochonkogenen HPV-Typen kann das Eingreifen in zentrale zelluläre Signalkaskaden durch E6 und E7 allerdings auch zur malignen Transformation führen (vgl. Kapitel 1.1.4).

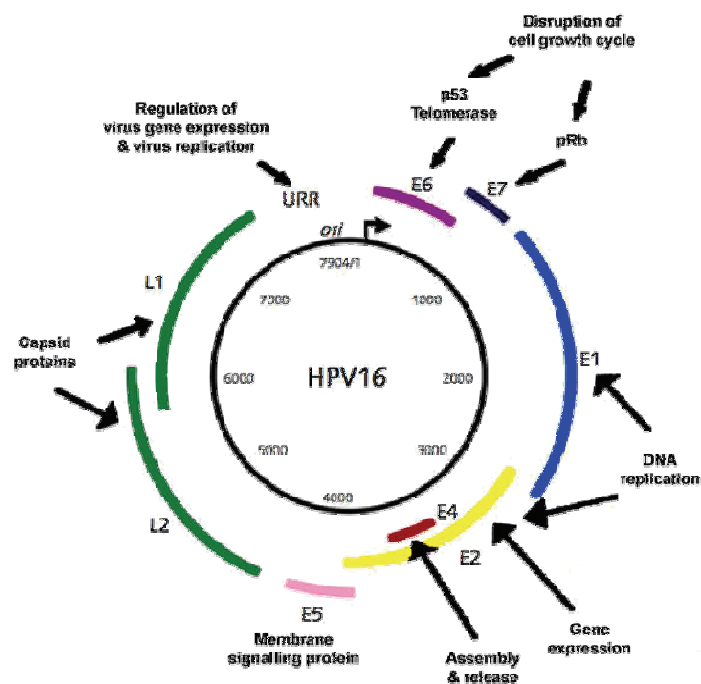


Abb. 1 Aufbau des Genoms von HPV16 und Funktion der viralen Proteine.

Das zirkuläre doppelsträngige DNA-Genom von HPV16 ist ca. 8 kb groß. Die Region der frühen Gene (E1-E7) ist von der der späten Gene (L1, L2) durch die Long Control Region (LCR; auch Upstream Regulatory Region, URR, genannt) getrennt, welche den Replikationsursprung (ori) sowie diverse Kontrollelemente enthält. Den Genen ist die jeweilige Funktion ihrer Produkte zugeordnet.

Obwohl in der frühen Region gelegen, wird der E4-ORF erst in der späten Phase des Replikationszyklus transkribiert, wobei durch alternatives Spleißen ein Fusionsprodukt aus den N-terminalen 5 Aminosäuren des E1-Leserahmens und der C-terminalen Domäne von E4 entsteht. Der E4-ORF selbst besitzt kein eigenes Startkodon. Die Funktion des 11 kDa großen E1/E4-Fusionsproteins ist noch unbekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass es eine Bedeutung für die virale Genomamplifikation und die Expression der Capsidproteine in der späten Phase des Replikationszyklus hat (Wilson *et al.*, 2007).

Die beiden Leserahmen in der späten Region kodieren für die 57 bzw. 75 kDa großen Capsidproteine L1 und L2, die in infektiösen Viruspartikeln in einem Verhältnis von etwa 30:1 vorliegen.

1.1.3. Der virale Replikationszyklus

Humane Papillomviren dringen über Mikroläsionen in Haut und Schleimhaut ein und infizieren dort ausschließlich Basalzellen. Der genaue Eintrittsmechanismus ist noch nicht geklärt. In der infizierten Zelle wird das virale Genom zunächst bis auf 50-400 Kopien vermehrt und passiv bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Der Multikopienstatus wird dabei weitestgehend konstant gehalten. Erreicht die Wirtszelle während ihrer Entwicklung einen ausdifferenzierten Zustand, beginnt die lytische Phase des viralen Replikationszyklus. Hierbei wird das Genom massiv repliziert, die späten Gene werden aktiviert und infektiöse Virusnachkommen werden produziert. Diese werden durch das natürliche Absterben der äußersten Hautzellschicht freigesetzt. Eine produktive Replikation erfolgt demnach in zwei Phasen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der epithelialen Wirtszelle.

Informationen zu Infektionsbiologie und Epidemiologie humaner Papillomviren (s. nachfolgendes Kapitel) sind in Scheurer *et al.*, 2005 zusammengefasst.

1.1.4. HPV-assoziierte Erkrankungen

Die Durchseuchung der menschlichen Bevölkerung mit Papillomviren, von denen bisher ca. 200 Subtypen identifiziert wurden, ist weltweit hoch. Die Übertragung erfolgt ab einem Alter von etwa 5 Jahren direkt oder über kontaminierte Gegenstände im familiären Bereich oder in

gemeinschaftlich genutzten Einrichtungen, wie Schwimmbädern oder Sportvereinen. Genitale Papillomviren werden durch Geschlechtsverkehr übertragen.

Bei den meisten Menschen verursachen die Viren gutartige Warzen, z.B. an Händen und Füßen (HPV1, HPV4, HPV26, HPV48 etc.), an Armen, Beinen und im Gesicht (HPV3, HPV10, HPV27 u. a.), im Mund-Rachenraum (z.B. mit HPV6- oder HPV11-assoziierte juvenile Larynxpapillome) oder im Anogenitalbereich. Zu letzterem zählen die Erkrankungen *Condylomata acuminata* und *bowenoide Papillose*, die u. a. mit den HPV-Typen 6, 11, 13, 16, 32, 33, 40, 42-44, 54 und 55 korrelieren. Gutartige Warzen, insbesondere an Händen und Füßen, bilden sich häufig spontan zurück. In manchen Fällen kommt es hingegen zur Entstehung von HPV-assoziierten Tumoren. Personen mit einer entsprechenden genetischen Prädisposition können nach Infektion mit den HPV-Typen 5, 8, 14, 17, 20 oder 47 eine als *Epidermodysplasia verruciformis* bezeichnete Erkrankung entwickeln, die sich durch Bildung multipler Warzen am gesamten Körper äußert, welche maligne entarten können. Hochonkogene HPV-Typen (z. B. HPV16, HPV18, HPV31, HPV45) sind darüber hinaus an der Entstehung von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN; cervical intraepithelial neoplasia) bzw. Gebärmutterhalskrebs beteiligt.

In den Industrienationen ist seit ca. 40 Jahren eine Rückläufigkeit bzgl. Neuerkrankungen und Todesfällen aufgrund von zervikalen Tumoren feststellbar. Dies ist vor allem auf die Einführung eines gesetzlichen Screening-Programms im Rahmen der Krebsfrüherkennung zurückzuführen. Es beinhaltet die histologische Untersuchung von zervikalen Gewebeproben (PAP-Abstrich) von Frauen ab einem Alter von 20 Jahren hinsichtlich neoplastischer Veränderungen sowie in weiterführenden Untersuchungen die Identifizierung und Klassifizierung von HPV-Typen (PCR). In den Entwicklungsländern werden nur an wenigen Frauen derartige Voruntersuchungen vorgenommen, so dass hier weiterhin eine hohe Inzidenz für zervikale Erkrankungen und Todesfälle besteht. Weltweit waren im Jahr 2002 fast 500000 Frauen an Gebärmutterhalskrebs erkrankt, 273000 Frauen starben. Damit gilt das Zervixkarzinom als zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Im Vergleich dazu steht das Zervixkarzinom in Deutschland laut Gesundheitsbericht des Robert-Koch-Instituts an elfter Stelle der Krebserkrankungen bei Frauen (Gesundheitsbericht 2008).

Seit 2006 (Nordamerika) bzw. 2007 (Europa) stehen zwei Impfstoffe zur Verfügung, die gegen die HPV-Typen 16 und 18 (Cervarix; GlaxoSmithKline, Belgien) bzw. 6, 11, 16 und 18 (Gardasil; Merck & Co AG, NJ, USA) gerichtet sind. Sie basieren auf rekombinant exprimierten L1-Proteinen, die sich zu nichtinfektiösen Virionen zusammenlagern und nach

Injektion die Produktion neutralisierender Antikörper induzieren (Koutsky und Harper, 2006). Die Impfung erfolgt intramuskulär in 3 Stufen (0, 2, 6 Monate).

1.1.5. Rolle von E6 und E7 hochonkogener HPV-Typen bei der Entstehung zervikaler Tumore

Die persistierende Infektion mit hochonkogenen HPV-Typen wird heute als Hauptursache für die Entwicklung von zervikalen Präkanzerosen und Karzinomen angesehen. Die HPV-Typen 16 und 18 beispielsweise werden mit ca. 70 % aller Zervixkarzinomfälle in Verbindung gebracht. Die Expression der viralen Gene E6 und E7 ist hierbei für die Etablierung und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps essentiell. Im Folgenden wird die Rolle von E6 und E7 bei der Entstehung des Zervixkarzinoms und seiner neoplastischen Vorstufen CIN I-III erläutert. Eine thematische Zusammenfassung hierzu findet sich in Übersichtsartikeln von zur Hausen, 2000 bzw. Munger *et al.*, 2001.

Das E6-Protein von HPV16 besteht aus 151 AS und enthält 2 mit Zinkionen komplexierte Zinkfingerdomänen, die durch das LXXLL Motiv gekennzeichnet sind, sowie eine C-terminale PDZ-Domäne. **Abb. 2** zeigt schematisch den Aufbau des HPV16 E6 Proteins.

E6 übt seine Funktion über eine direkte Wechselwirkung mit zellulären Proteinen aus. Als eines der ersten zellulären Bindungspartner von E6 wurde das E6-AP (E6-assoziiertes Protein), eine Ubiquitin-abhängige Ligase, identifiziert. Die Komplexbildung zwischen E6 und E6-AP resultiert in einer Interaktion mit einem weiteren zellulären Faktor, welcher daraufhin durch E6-AP ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom degradiert wird. Auf diese Weise werden z.B. das Tumorsuppressorprotein p53, die DNA-Methyltransferase MGMT, das an der eukaryontischen Replikation beteiligte und für chromosomale Stabilität essentielle hMCM7 (*human minichromosome maintenance 7*), das pro-apoptotische Protein Bak, der Wachstumsregulator c-Myc oder der hTERT-Inhibitor NFX1 inaktiviert. Letzteres führt zur Aktivierung der Telomerase, ein wichtiger Schritt zur Immortalisierung, d. h. zeitlich unbegrenztem Wachstum, und später zur malignen Transformation.

Zu den zellulären Proteinen, die durch E6 gebunden und E6-AP-unabhängig abgebaut werden, zählen z.B. die Apoptose-Mediatoren FADD (*Fas-associated death domain*) und Procaspase 8 (Wechselwirkung über *death effector*-Domänen), die p53-Coaktivatoren CBP/p300 und Gps2 sowie der *Interferon-regulatorische Faktor 3* (IRF-3), welcher eine Interferon-induzierte Immunantwort nach einer Virusinfektion vermittelt.

Zelluläre Proteine wie z.B. Paxillin, Zyxin, Fibulin-1, hScrib (humanes Homolog des *Drosophila*-proteins *Scribble*), hDlg (humanes Homolog zum *Drosophila*-Protein *Disc large*) oder Mitglieder der MAGI-Proteinfamilie, die für die epitheliale Integrität von Bedeutung sind, indem sie die Zell-Matrix-Adhäsion bzw. Zell-Zell-Adhäsion positiv beeinflussen oder die Polarität einer Zelle bestimmen, stellen einen proliferationslimitierenden Faktor dar. Die Bindung und Inaktivierung dieser Faktoren durch E6 trägt daher zu einer erfolgreichen Replikation humaner Papillomviren und im Falle von hochonkogenen HPV-Typen vermutlich auch zur malignen Transformation bei.

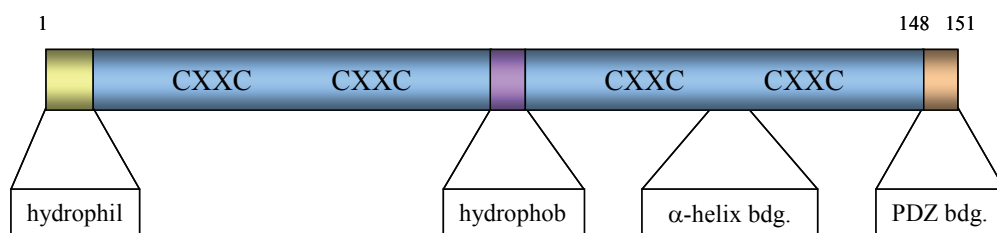


Abb. 2 Domänenstruktur des E6-Proteins von HPV16.

Das HPV16 E6-Protein ist 151 AS lang und besitzt 2 Zinkfingerdomänen. Es kann über die angegebenen Bindemotive mit verschiedenen zellulären Partnern interagieren.

Das E7-Protein von HPV16 besteht aus 98 Aminosäuren und besitzt C-terminal eine mit Zinkionen komplexierte Zinkfingerdomäne sowie N-terminal gelegen zwei *Conserved Region – Homology Domains* (CR-HD). Letztere erhielten aufgrund der Homologie zu den CR-Domänen der E1A-Proteine der hochonkogenen Adenovirustypen ihre Bezeichnung. In der zweiten CR-HD befindet sich ein LXCXE-Motiv, welches in Proteinen verschiedener DNA-Tumorstörern (E7-Proteine der hochonkogenen HPV-Typen, E1A-Proteine der hochonkogenen Adenovirustypen und Large T Antigen des SV40) konserviert ist. Über dieses Motiv erfolgt die Bindung der entsprechenden Proteine an Rb und andere Mitglieder der Pocket Proteinfamilie. Die Domänenstruktur von HPV16 E7 ist in **Abb. 3** dargestellt.

Da der Lebenszyklus humaner Papillomviren einerseits stark von der Verfügbarkeit der zellulären Replikationsmaschinerie abhängt, andererseits jedoch z.B. das Umschalten von der Expression früher Gene auf die Expression später Gene oder die Synthese viraler Capsidproteine nur aufgrund des ausdifferenzierten Zustands der Wirtszelle möglich sind, muss der Virus eine Entkopplung von Zelldifferenzierung und -proliferation herbeiführen.

Dies ist eine der Hauptfunktionen von E7; es bindet und inaktiviert negative Regulatoren des Zellzyklus, wodurch die differenzierte Wirtszelle in einem DNA-replikationskompetenten Zustand gehalten wird. Neben den bereits erwähnten Pocket Proteinen gehören hierzu auch CDKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) wie Mitglieder der p21^{Cip1}- und p27^{Kip1}-Familien. Dies resultiert in der Aktivierung E2F-abhängiger Gene, die essentiell für die DNA-Synthese bzw. –Replikation sind, wie beispielsweise die Dehydrofolatreduktase, die DNA-Polymerase α , die Thymidinkinase, das Cyclin E oder die Tyrosinphosphatase CDC25. Darüber hinaus wird die Resistenz E7-exprimierender humaner Keratinozyten gegenüber wachstumshemmenden bzw. apoptoseinduzierenden Zytokinen wie TGF- β oder TNF- α ebenfalls auf die Inaktivierung der Pocket Proteine bzw. CDKIs durch E7 zurückgeführt. Andere Zytokine wie z.B. Interferone, die die zelluläre Abwehr bei Virusinfektionen vermitteln, werden ebenfalls durch die Expression von E7 in ihrer Funktion gehemmt. Beispielsweise interagiert E7 mit IRF-1, AP1 und der Histondeacetylase Mi2 β , wodurch die IFN- γ -induzierte antivirale Immunantwort inhibiert wird. Für E7 ist des Weiteren eine transkriptionsmodulierende Wirkung gezeigt worden, indem es an zelluläre Faktoren wie TBP oder TAF110 bindet.

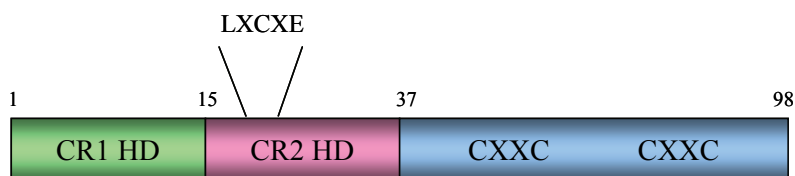


Abb. 3 Domänenstruktur des E7-Proteins von HPV16.

Das HPV16 E7-Protein ist 98 AS lang und besteht aus einer Zinkfingerdomäne sowie zwei den *Conserved Regions* der E1A-Proteine onkogener Adenoviren homologen Domänen (CR-HD). In der CR2-HD befindet sich das LXCXE-Bindemotiv, über das E7 mit Rb und anderen Pocket Proteinen wechselwirkt.

Stark proliferierende Zellen zeichnen sich unter anderem durch einen hohen metabolischen Umsatz aus. Dies schließt auch maligne transformierte Zellen ein. Charakteristisch ist in diesem Zusammenhang eine modulierte Aktivität glykolytischer Enzyme, wie z.B. der M2-Pyruvatkinase oder der α -Glukosidase. Es ist beschrieben worden, dass E7 direkt mit diesen Enzymen in Wechselwirkung treten und ihre Aktivität, ähnlich wie in Tumorzelllinien beobachtet, beeinflussen kann.

Sowohl E6 als auch E7 sind in der Lage, chromosomale Instabilität zu induzieren, welche sich u. a. durch Aneuploidie äußert. E7-exprimierende Zellen weisen eine abnormale Zentrosomenanzahl auf, die durch eine gesteigerte Synthese von Zentriolen verursacht wird. Im Gegensatz dazu wird die Aneuploidisierung in E6-exprimierenden Zellen vor allem auf eine Multinukleisierung zurückgeführt. Ob die Induktion chromosomaler Aberrationen eine Voraussetzung für die maligne Transformation humaner Zellen darstellt oder ob sie lediglich ein Nebeneffekt des Transformationsprozesses ist und z.B. durch den Verlust von Zellzyklus-Kontrollpunkten hervorgerufen wird, bleibt weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Dieser Aspekt der Tumorentstehung wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.2. *In vitro* Tumorprogressionsmodelle

1.2.1. Definierte genetische Elemente als Basis für *in vitro* Tumorprogressionsmodelle

Im Jahre 1999 publizierten W. C. Hahn und Kollegen Daten zu einem *in vitro* Tumorprogressionsmodell, welches sie an humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-Zellen) bzw. humanen BJ-Fibroblasten etabliert hatten, in dem sie die cDNA bzw. DNA von 1. hTERT, 2. onkogenem H-Ras und 3. der *Early Region* von SV40, welche die viralen Onkogene Large T und small t kodiert, in die jeweiligen Zellen einbrachten (Hahn *et al.*, 1999). Die Autoren konnten zeigen, dass derartig veränderte Zellen zur Koloniebildung in Softagar und zur Entwicklung von Tumoren in immundefizienten Mäusen in der Lage waren. Die Ergebnisse untermauerten ihre Ansicht, dass weniger eine massive chromosomale Instabilität zur malignen Entartung humaner Zellen führt. Vielmehr müssten spezifische zentrale Signalwege in einer Zelle moduliert sein, um einen malignen Phänotyp zu induzieren. Zentrale Ereignisse in diesem Zusammenhang wären demnach 1. die Inaktivierung von p53, 2. die Inhibierung von Rb, 3. die konstitutive Aktivität von Ras sowie 4. die Verlängerung der Telomere, z.B. durch Aktivierung der Telomerase. In späteren Publikationen wurde zudem gezeigt, dass die Inhibierung der Proteinphosphatase 2A (PP2A) z. B. durch SV40 small t eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt (Hahn *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004). In

den letzten Jahren sind aufgrund von derartigen, genetisch definierten Modellsystemen weitere zelluläre Faktoren und Signalwege identifiziert worden, die zu verschiedenen Aspekten der malignen Transformation, darunter auch Migration und Metastasierung, beitragen. Eine Liste von *in vitro* Tumorprogressionsmodellen, die für ihre Etablierung benutzten Zelltypen und genetischen Elemente sowie deren Wirkung sind in **Tab. 1** aufgeführt. Der Vorteil dieser experimentellen *in vitro* Modelle besteht darin, gezielt zelluläre Faktoren modulieren und ihre Rolle bei der zellulären Transformation untersuchen zu können. Nachfolgend werden einige der genannten zellulären Regulatoren und ihre Bedeutung für Immortalisierungs- und Transformationsprozesse näher beleuchtet. Zusammenfassende Informationen hierzu finden sich in Schinzel und Hahn, 2008. **Abb. 4** zeigt eine schematische Übersicht der an Immortalisierung und Transformation humaner Zellen beteiligten Signalwege.

1.2.2. hTERT und Telomerase

Ein wichtiges Merkmal tumorigener Zellen ist ihre Fähigkeit, immortal zu sein, d. h. sich unbegrenzt teilen zu können. Um den Zustand der Immortalität erreichen zu können, müssen humane Zellen zwei Barrieren überwinden, die normalerweise ihre Lebensspanne einschränken. Die erste Barriere wird als replikative Seneszenz bezeichnet und äußert sich bei *in vitro* Kulturen durch einen irreversiblen Proliferationsstopp sowie eine veränderte Zellmorphologie, wobei die Zellen jedoch weiterhin metabolisch aktiv bleiben (Wright und Shay, 2001). Zellen, die die Seneszenzbarriere überwunden haben, erreichen schließlich einen als Krise definierten Punkt, an dem innerhalb der Kultur ein massives Zellsterben einsetzt, wobei die Zellen weiterhin stark proliferieren. Darüber hinaus weisen in Krise befindliche Zellen eine massive chromosomale Instabilität auf (Wei und Sedivy, 1999).

Alternde Säugerzellen sind u. a. durch eine Verkürzung ihrer Chromosomenenden gekennzeichnet (Harley *et al.*, 1990). Diese bestehen aus der wiederholten Abfolge einer kurzen Nukleotidsequenz – beim Menschen TTAGGG – die als Telomere bezeichnet werden. Eine kritische Telomerlänge kann in ausdifferenzierten Zellen zur Induktion der replikativen Seneszenz bzw. Krise führen (de Lange, 2002). In Stammzellen und pluripotenten Zellen, die z.B. für die Geweberegeneration nötig sind, werden die Telomere hingegen durch ein Telomerase genanntes Enzym kontinuierlich mit Hilfe einer internen RNA-Matrize verlängert (Harrington *et al.*, 1997, Meyerson *et al.*, 1997, Nakamura *et al.*, 1997).

Tab. 1 Zusammenfassung von in der Literatur beschriebenen *in vitro* Tumorprogressionsmodellen

Kombination von Genen				Humane Zelltypen	Referenzen
hTERT	LT	ST	RAS	Fibroblasten, embryonale Nierenepithelzellen, Brustepithelzellen, Epithelzellen der Atemwege, Gliazellen, Endothelzellen, Epithelzellen der Gebärmutter, Mesothelzellen	Hahn <i>et al.</i> , 1999, Elenbaas <i>et al.</i> , 2001, Rich <i>et al.</i> , 2001, Yu <i>et al.</i> , 2001, Zimonjic <i>et al.</i> , 2001, Lundberg <i>et al.</i> , 2002, MacKenzie <i>et al.</i> , 2002, Zhao <i>et al.</i> , 2003, Liu <i>et al.</i> , 2004b
hTERT	HPV16 E6 and E7	ST	RAS	Fibroblasten, embryonale Nierenepithelzellen	Yu <i>et al.</i> , 2001, Hahn <i>et al.</i> , 2002
hTERT	CyclinD1, CDK4 ^{R24C} , p53DD	ST	RAS	Fibroblasten	Hahn <i>et al.</i> , 2002
hTERT	CyclinD1-CDK4 ^{R24C} , p53 ^{-/-}	ST	RAS	Fibroblasten	Wei <i>et al.</i> , 2003
hTERT	p16 ^{INK4a} -defizient		RAS+MYC	Fibroblasten	Drayton <i>et al.</i> , 2003
Telomerase	E1A und MDM2		RAS	Fibroblasten	Seeger <i>et al.</i> , 2002
Telomerase	CDK4		RAS	Keratinocyten	Lazarov <i>et al.</i> , 2002
hTERT	LT	B56g-shRNA	RAS	embryonale Nierenepithelzellen	Chen <i>et al.</i> , 2004, Moreno <i>et al.</i> , 2004
hTERT	LT	Aa-shRNA	RAS	embryonale Nierenepithelzellen	Chen <i>et al.</i> , 2005
hTERT	LT	PI3K	RAS	Brustepithelzellen	Zhao <i>et al.</i> , 2003
hTERT	LT	MYC	RAS	embryonale Nierenepithelzellen	Yeh <i>et al.</i> , 2004
hTERT	HPV16 E6 und E7		K-RAS	endometriale Epithelzellen	Mizumoto <i>et al.</i> , 2006
Telomerase	CyclinD1, dnp53	MYC	EGFR	oral-ösophageale Plattenepithelzellen	Rich <i>et al.</i> , 2001
hTERT	p53DD, shRb	ST, MYC	RAS	embryonale Lungenfibroblasten	Boehm <i>et al.</i> , 2005
hTERT	p53DD, shRb	shPTEN, MYC	RAS		
hTERT	HPV16 E6 und E7	ST	RAS	Pankreaszellen	Campbell <i>et al.</i> , 2007
hTERT	LT	PI3K	Myc	epitheliale Zellen der Prostata	Liu <i>et al.</i> , 2004b

Angegeben sind die verwendeten genetischen Elemente, der transformierte Zelltyp und ein entsprechender Literaturverweis. Die Tumorigenität der generierten Zellen wurde mittels Softagarassay sowie subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse überprüft

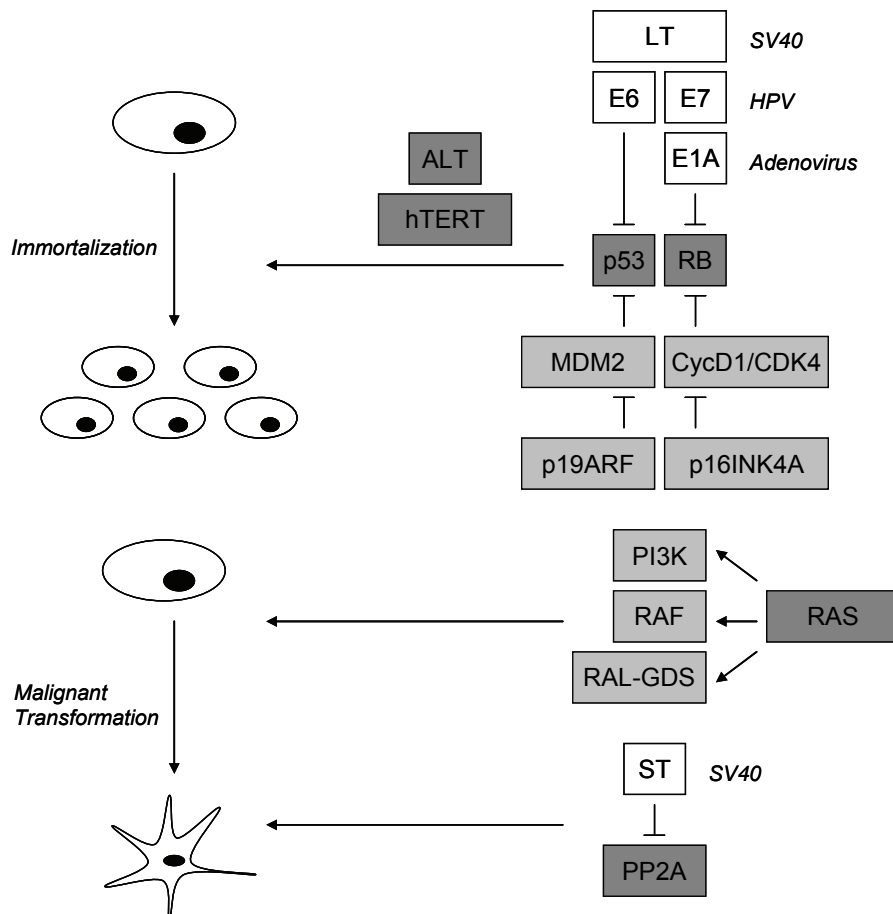


Abb. 4 An der zellulären Immortalisierung und Transformation beteiligte Signalwege (aus Schinzel und Hahn, 2008).

Die Verhinderung der Telomerverkürzung (z.B. durch Expression von hTERT oder den ALT-Mechanismus) zusammen mit einer Disruption des p53- und Rb-Signalweges ermöglicht humanen Zellen eine Überwindung von Seneszenz und Krise und führt somit zu deren Immortalisierung. Die Tumorsuppressorproteine p53 und Rb können sowohl durch intrazelluläre Faktoren wie MDM2 oder p16^{Ink4a} als auch durch virale Onkoproteine wie HPV16 E6 und E7 oder SV40 LT inhibiert werden. Eine zusätzliche Modulation von Ras-Effektorwegen und der Aktivität der PP2A (z.B. durch SV40 st) können in einer malignen Transformation immortalisierter humaner Zellen resultieren.

Die aktive Telomerase besitzt neben der RNA-Matrize hTR/TERC zwei weitere Untereinheiten – das katalytisch aktive Protein hTERT und das Dyskerin-Molekül (Cohen *et al.*, 2007).

In 85-90% aller humanen Tumorzellen findet man eine deutlich höhere Telomerase-Aktivität verglichen mit entsprechenden normalen Zellen (Counter *et al.*, 1995, Shay und Bacchetti, 1997, Kim *et al.*, 2006). In den restlichen 10-15% lässt sich ein alternativer Mechanismus zur Telomerverlängerung (ALT; *alternative telomere lengthening*) nachweisen, bei dem wahrscheinlich Sequenzaustausche zwischen Telomeren von Schwesterchromatiden stattfinden (Bryan *et al.*, 1995, Reddel *et al.*, 1997, Dunham *et al.*, 2000, Bechter *et al.*, 2003, Bailey *et al.*, 2004). Durch das Expressieren von hTERT können darüber hinaus viele humane

Zelltypen immortalisiert werden (Bodnar *et al.*, 1998, Foster *et al.*, 1998, Dickson *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Telomerverlängerung eine bedeutende Rolle bei der Überwindung der Seneszenz- und Krisenbarriere spielt und somit einen wichtigen Schritt bei der Tumorigenese humaner Zellen darstellt.

1.2.3. Rb

RB wurde ursprünglich als ein Tumorsuppressorgen identifiziert, welches in Retinoblastomen bei Kindern hauptsächlich durch LOH (*loss of heterozygosity*) inaktiviert wird (Knudson, 1971, Friend *et al.*, 1986, Knudson, 1986). Heute weiß man, dass die Funktion von Rb in vielen Tumoren durch verschiedenste Mechanismen inhibiert wird: Eine Deletion, Methylierung oder Mutation des *RB*-Gens ist für Osteosarkome, kleinzellige Lungenkarzinome und Hirntumore gezeigt worden (Yin *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004a). In HPV-assoziierten Zervixkarzinomen wird das Rb-Protein durch E7 inaktiviert (zur Hausen, 1996). In Mammakarzinomen, B-Zell-Lymphomen und Epithelzellkarzinomen tritt häufig eine Amplifikation des Cyclin D1- und/oder *CDK4*-Gens auf, wodurch eine Hyperphosphorylierung und somit eine funktionelle Inaktivierung von Rb hervorgerufen wird (Hunter und Pines, 1994, Weinberg, 1995). Für Mammakarzinome, Hepatokarzinome, Melanome u. a. Tumore ist zudem der Verlust des Cyclin D1/CDK4-Inhibitors p16^{Ink4a} beschrieben worden (Hunter und Pines, 1994, Esteller *et al.*, 2001, Loercher *et al.*, 2005).

Neben seiner Funktion als negativem Zellzyklusregulator und anti-apoptotischem Effektor (Johnson und Schneider-Broussard, 1998, Classon und Harlow, 2002) wird für Rb auch eine Bedeutung für die Induktion einer stressbedingte Seneszenz angenommen (Serrano *et al.*, 1997, Ramirez *et al.*, 2001, Romanov *et al.*, 2001, de Lange, 2002). Eine Modulation des Rb-Signalweges scheint daher entscheidend zur zellulären Transformation beizutragen.

1.2.4. p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein pleiotroper Faktor, der nach DNA-Schädigung und unter metabolischem Stress einen Zellzyklusarrest induzieren kann, so dass die zellulären Reparatursysteme greifen können (Gomez-Lazaro *et al.*, 2004). Sind Stress bzw. DNA-Schaden zu massiv, kann p53 einen programmierten Zelltod einleiten (Gomez-Lazaro *et al.*, 2004). Zudem wird für p53 eine direkte Rolle bei der Induktion der replikativen Seneszenz

vermutet (Hara *et al.*, 1991, Bond *et al.*, 1994, Beausejour *et al.*, 2003). Ein Verlust der p53-Funktion hat daher häufig eine Verhinderung von Apoptose bzw. Seneszenz, eine gesteigerte Proliferation sowie eine Akkumulation von Mutationen zur Folge (Vogelstein *et al.*, 2000). In Verbindung mit einer Disruption des Rb-Signalweges führt eine Inhibierung der p53-Aktivität *in vitro* in vielen humanen Zelltypen zur Immortalisierung (Shay und Wright, 1989, Hahn *et al.*, 2002, Voorhoeve und Agami, 2003).

Mutationen oder Deletionen im *TP53*-Gen wurden in ca. 50 % aller Tumore gefunden (Vousden und Lu, 2002). Eine direkte Korrelation zwischen mutierten *TP53*-Allelen und der Entwicklung von Tumoren ist für das Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben. Betroffene weisen eine erhöhte Anfälligkeit für eine Reihe maligner Erkrankungen auf, darunter z.B. Adrenokortikokarzinome, Sarkome, Brust- oder Lungenkrebs (Olive *et al.*, 2004). In anderen Tumoren ist darüber hinaus eine Modulation von p53-regulierenden zellulären Faktoren gezeigt worden. Beispielsweise ist p14^{ARF}, das auf demselben Locus wie p16^{INK4a} liegt (Sherr und DePinho, 2000) und einen Antagonisten des p53-Inhibitors MDM2 darstellt (Kamijo *et al.*, 1998), in diversen Tumoren inklusive Blasenkarzinomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Melanomen und Glioblastomen häufig deletiert (Esteller *et al.*, 2001).

1.2.5. H-Ras

Ras-Proteine sind GTPasen, die Zellproliferation, -differenzierung und -überleben in Abhängigkeit von extrazellulären Wachstumsfaktoren regulieren (zusammengefasst in Schubbert *et al.*, 2007). Positive Wachstumssignale resultieren in einer Aktivierung von Ras durch Bindung von GTP unter Beteiligung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs). Umgekehrt erfolgt eine Inaktivierung von Ras durch eine hydrolytische Umwandlung des gebundenen GTP zu GDP, die durch GTPase-Aktivierungsproteine (GAPs) vermittelt wird. Mutationen im Tumorsuppressorgen NF-1 (*neurofibromatosis protein 1*), das für ein GAP-Protein kodiert, werden mit einer übermäßigen Ras-Aktivität in Verbindung gebracht. Entsprechende Personen besitzen eine höhere Prädisposition für die Entwicklung von z.B. Neurofibrosarkomen, Astrozytomen, Phäochromozytomen sowie juvenilen myelomonozytischen Leukemien (Cichowski und Jacks, 2001).

Es gibt drei Mitglieder der Ras-Familie, die gewebespezifisch exprimiert werden – N-Ras, K-Ras und H-Ras. Mutationen in *K-RAS* können in diversen Tumoren nachgewiesen werden, u.a. in Lungen-, Bauschspeicheldrüsen- und Eierstockkrebs (Mitsuuchi und Testa, 2002, Schneider und Schmid, 2003, Mammas *et al.*, 2005). Mutationen in *N-RAS* wurden

hauptsächlich in Melanomen und myeloiden Leukemien detektiert (van Elsas *et al.*, 1997, Kelly und Gilliland, 2002). Mutationen in *H-RAS* treten gehäuft in Blasenkarzinomen auf, sind im Allgemeinen jedoch eher selten (Oxford und Theodorescu, 2003).

Ein proliferationsinduzierendes Signal kann von Ras über verschiedene Wege weitergeleitet werden (zur Übersicht s. Downward, 2003). Hierzu gehören der Raf-Mek-Erk-Signalweg, der PI3-Kinase-Signalweg sowie der Ral-GDS-Signalweg. Mutationen in diesen Signalkaskaden, insbesondere im PI3K-Signalweg, sind für viele Tumore beschrieben worden (McCubrey *et al.*, 2007, Yuan und Cantley, 2008).

In Kombination mit anderen Onkogenen, z.B. SV40 LT und c-Myc, kann H-Ras in humanen Zellen eine Transformation induzieren. Allerdings scheinen je nach Zelltyp unterschiedliche Ras-Effektor-Signalwege moduliert zu werden, um einen malignen Phänotyp zu erzeugen (Rangarajan *et al.*, 2004, Boehm *et al.*, 2005). In einigen Versuchen beispielsweise erforderte die Transformation humaner Brustepithelzellen (HMEC) die gemeinsame Aktivierung der PI3K-, Ral-GDS- und Raf-Wege. Im Gegensatz dazu reichte in manchen Studien eine Modulation der PI3K- und Ral-GDS-Signalkaskaden aus, um humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK-Zellen) zu transformieren (Rangarajan *et al.*, 2004). Andererseits konnte für HEK-Zellen gezeigt werden, dass H-Ras durch verschiedene Kombinationen von Faktoren ersetzt werden kann, die die PI3K- und Raf-Mek-Erk-Signalwege aktivieren (Boehm *et al.*, 2007). Derzeit werden Untersuchungen zur genauen Identifizierung der Ras-Effektor-Signalwege durchgeführt, die in unterschiedlichen Tumorsubtypen zur malignen Transformation beitragen, um individuelle Klassifizierungsmethoden und Therapieansätze entwickeln zu können.

1.2.6. PP2A

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die u. a. an der Zellwachstums- und –proliferationskontrolle beteiligt ist. Sie besteht aus drei Untereinheiten – einer katalytischen C-Untereinheit, einer strukturellen A-Untereinheit sowie einer regulatorischen B-Untereinheit. Für die humanen A- und C-Untereinheiten wurden jeweils 2 unterschiedliche Isoformen beschrieben, von der humanen B-Untereinheit sind 17 verschiedene Isoformen bekannt (zur Übersicht s. Arroyo und Hahn, 2005). SV40 st kann an PP2A binden und deren Funktion hemmen, vermutlich indem es die regulatorische B-Untereinheit verdrängt, und so in Verbindung mit z.B. SV40 LT, H-Ras und hTERT in verschiedenen humanen Zelltypen eine maligne Transformation induzieren (Pallas *et al.*,

1990, Rundell und Parakati, 2001, Hahn *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004). Eine Suppression der B56-gamma-Untereinheit kann SV40 st in denselben Modellen funktionell ersetzen (Chen *et al.*, 2004). Diese und andere Studien lassen vermuten, dass B56-gamma-enthaltende PP2A-Komplexe Substrate regulieren, die zur zellulären Transformation beitragen. Der genaue Mechanismus ist in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass der PI3K-Akt-Signalweg eine wichtige Rolle hierbei spielt (Zhao *et al.*, 2003, Trotman *et al.*, 2006).

In einigen Melanomen, Brust-, Lungen- sowie Darmkarzinomen wurden Mutationen in den Genen identifiziert, die für die PP2A-A-alpha- bzw. A-beta-Untereinheit kodieren (Wang *et al.*, 1998, Ruediger *et al.*, 2001). Derartige Mutationen verhindern die Bildung aktiver PP2A-Komplexe. Im Fall der A-alpha-Untereinheit führt dies zu einer funktionellen Haploinsuffizienz mit tumorsuppressiver Wirkung verursacht durch eine reduzierte Menge an PP2A-A-alpha/B56-gamma-enthaltenden Komplexen.

Von Junttila *et al.* wurde 2007 ein endogener PP2A-Inhibitor (CIP2A; *cancerous inhibitor of PP2A*) beschrieben, der in diversen Tumoren und Tumorzelllinien verstärkt exprimiert wird und zu deren tumorigenem Phänotyp beiträgt (Junttila *et al.*, 2007).

1.3. Ziel der Arbeit

Die Proteine E6 und E7 hochonkogener HPV-Typen sind maßgeblich an der Entwicklung intraepithelialer Neoplasien und Karzinome der Zervix beteiligt. Als Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Interaktionen zwischen diesen viralen Onkoproteinen und zellulären Faktoren *in vitro* werden klassischerweise humane Vorhautkeratinozyten (HFK) herangezogen, die nach stabiler Integration eines retroviralen Vektors die viralen Gene E6 und/oder E7 von z.B. HPV16 exprimieren. Diese Zellen, die im Folgenden mit HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 abgekürzt werden, bildeten auch die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

Zunächst stellte sich die Frage, ob sich in HPV16 E6/E7 – positiven Vorhautkeratinozyten differenziell exprimierte Gene ermitteln lassen würden, die als neue Marker für histopathologische Untersuchungen zervikaler Biopsien in der Diagnostik eingesetzt werden könnten. Hierzu sollten Mikroarray-Analysen an HFK-E6/E7-Zellen durchgeführt werden. Die Expression interessanter Kandidatengene sollte dann mittels quantitativer RT-PCR und

Western blot-Analysen verifiziert werden. Auf diese Weise bestätigte differenzielle Genexpressionsmuster sollten anschließend mittels immunhistochemischer Verfahren an zervikalen Gewebeschnitten (Normalgewebe, CIN I-III, Carcinoma *in situ*, invasives Karzinom) überprüft werden, um die Eignung der identifizierten Gene als diagnostische Marker einschätzen zu können.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welche zellulären Signalwege in den HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten moduliert werden müssten, um eine maligne Transformation induzieren zu können, um so Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen bei der HPV16-vermittelten Tumorentstehung ziehen zu können. Analog den unter 1.2 erläuterten Modellen sollten hierzu in den HFK-E6/E7-Zellen mittels retroviraler Transfektion verschiedene Onkogene (H-Ras, c-Myc, SV40 st, CIP2A) stabil exprimiert bzw. überexprimiert werden. Die generierten Zellen sollten anschließend auf einen tumorigenen Phänotyp getestet werden. Hierfür sollte ihre Fähigkeit zur Kolonieformation in Softagar und zur Induktion der Tumorbildung *in vivo* nach subkutaner Injektion in immundefiziente Nacktmäuse überprüft werden.

Darüber hinaus sollte ähnlich wie für humane Vorhautkeratinozyten ein *in vitro* Tumorprogressionsmodell an normalen humanen Bronchialepithelzellen etabliert werden. Hierzu sollten retrovirale Vektoren, die die genetische Information für hTERT, SV40 LT, H-Ras bzw. c-Myc, SV40 st bzw. CIP2A, in primäre humane Bronchialepithelzellen eingeschleust werden. Anschließend sollten diese Zellen bzgl. ihrer tumorigenen Eigenschaften, d.h. ihrer Fähigkeit, Kolonien in Softagar bzw. Tumore nach subkutaner Injektion in immundefizienten Nacktmäusen bilden zu können, untersucht werden.

2. Material

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“), Lösungsmittel sowie allgemeiner Laborbedarf wurden in der erforderlichen Qualität vom Fachhandel bezogen.

2.1. Chemikalien

Agarose	PeqLab, Erlangen
Ampicillin	Grünenthal, Aachen
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
5-Aza-2-deoxycytidin	Sigma
Bacto-Agar	Difco/BD Biosciences, Heidelberg
BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, OH, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hexadimethrinbromid (Polybrene)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Noble-Agar	Difco/BD Biosciences, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tryptone/Peptone	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2. Puffer und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Biomol, Hamburg
Ampicillin-Lösung	50 mg/ml Ampicillin in A. dest.
APS-Lösung	10 % (w/v) APS in A. dest.
BES-Puffer	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,95
Colchizin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
DNA/RNA-Probenpuffer (5x)	150 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % Glycerin
Eosin-Färbelösung	Chroma, Münster
4 % Formaldehyd-Lösung	Fischar, Saarbrücken
Gel-Färbelösung (SDS-PAGE)	450 ml A. dest.

	450 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R250
Gel-Fixierlösung (SDS-PAGE)	50 % (v/v) 2-Propanol
	7 % (v/v) Essigsäure
Giemsa-Färbelösung	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung (Mayer's Hämalan)	Chroma, Münster bzw. Merck, Darmstadt
PBS	4 mM MgSO ₄
	7 mM CaCl ₂
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄
PBS ⁼	wie PBS ohne MgSO ₄ und CaCl ₂
Protein Assay Dye Reagent (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad, München
PS-Lösung	1,5 g Penicillin
	2,5 g Streptomycin
	2 g NaCl
	0,1 g KCl
	0,25 g Glukose
	0,1 g NaHCO ₃
	mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
RIPA-Lysepuffer	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl, pH 6,8 0,6 M DTT 12 % (w/v) SDS 60 % Glycerin 0,6 % Bromphenolblau
Sörensen-Puffer, pH 6,5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TAE-Puffer (1 x)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
TBS (1 x)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween	0,1 % (v/v) Tween in 1 x TBS
Transferpuffer (Western Blot)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Trypsin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

VT(Versen-Trypsin)-Lösung 0,5 M EDTA
2,5 g/l Trypsin in PBS⁼⁼

2.3. Nährmedien

LB-Medium 10 g NaCl
10 g Tryptone/Peptone
5 g Yeast Extract
ad. 1 Liter A.dest.

2.4. Enzyme

Restriktionsendonukleasen Roche, Mannheim; Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin (Rinderpankreas; 110 U/mg) Roche, Mannheim

2.5. Antikörper

2.5.1. Primär-Antikörper (monoklonale IgG-AK)

anti-Actin Ziegen-AK (I-19) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

anti-Decorin Ziegen-AK (N15) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

anti-HPV16E6/18E6 Maus-
AK (C1P5) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

anti-HPV16E7 Maus-AK (ED17) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

anti-c-Myc Maus-AK (C33) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

anti-H-Ras Kaninchen-AK (C-21)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-p21 Ziegen-AK (N-20-G)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-p53 Maus-AK (Do-I)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-Rb Maus-AK (G3-245)	BD Pharmingen/BD Biosciences, Heidelberg
anti-SV40 T-Antigen Maus-AK (PAb419)	Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt
anti-Twist1 Ziegen-AK (N-19)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-Wnt4 Ziegen-AK (C-14)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-WT1 Kaninchen-AK (C-19)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

2.5.2. Primär-Antikörper (polyklonale IgG-AK für IHC)

anti-CIP2A Kaninchen-AK (IHC)	Novus Biologicals Inc., Littleton, USA
-------------------------------	--

2.5.3. Sekundär-Antikörper (polyklonale Peroxidase-konjugierte IgG-AK)

anti-Kaninchen Ziegen-AK	Pierce, Rockford, IL, USA
anti-Maus Ziegen-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-Ziegen Affen-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

2.6. Molekulargewichtsstandards

1 kb Plus DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
----------------------	-----------------------

100 bp DNA-Leiter Invitrogen, Karlsruhe

Precision Plus Protein Standard
(Dual Color) Bio-Rad, München

2.7. Oligonukleotide

Die Sequenzen für eigene Primer wurden mit Hilfe des online-Programms Primer3 von 123Genomics (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) ermittelt. Alle Oligonukleotide wurden bei den Firmen metabion (Martinsried) oder Eurogentech (Köln) synthetisiert.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Referenz</u>
CIP2A-F	GCTTGAAGTCCTTGCTCCTG	eigen
CIP2A-R	CAAGGCAACTCAAGCATTCA	eigen
GAPDH-sense	TGGATATTGTTGCCATCAATGACC	Aguilar-Lemarroy <i>et al.</i> , 2002
GAPDH-antisense	GATGGCATGGACTGTGGTCATG	
E6-F	ATCCATATGCTGTATGTGAT	Schröer N., Diplomarbeit, Universität zu Köln
E6-R	AACAAGACATACATCGACCG	
E7-sense	CCCAGCTGTAATCATGCATG	Aguilar-Lemarroy <i>et al.</i> , 2002
E7-antisense	TGCCCATTAACAGGTCTTCC	
hTERT-sense	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
hTERT-antisense	GGATGAAGCGGAGTCTGGA	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
pBABE-5'	CCGCCTCAATCCTCCCTTTAT	Nolte, C., med. Doktorarbeit, Universität Essen
pBABE-3'b	AGTTAGGGGCGGGACTAT	

SV40-st-wt-F	GCTTCTTCCTTAAATCCTGGTG	Campbell <i>et al.</i> , 2007
SV40-st-wt-R	GAAGCAGTAGCAATCAACCC	Campbell <i>et al.</i> , 2007
SV40-st1-110-F	TGCAAGGAGTTTCATCCTGA	eigen
SV40-st1-110-R	TCAGGCCATTGTTTGCAGTA	eigen

2.8. Plasmide

Alle retroviralen Vektoren wurden von Prof. W.C. Hahn, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA bzw. Prof. R.A. Weinberg, Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Boston, MA, USA entweder direkt oder über die Plasmid-Plattform Addgene (www.addgene.com) zur Verfügung gestellt.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
pBABEpuro	Retroviraler Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenzkassette
pBABEpuro-H- <i>ras</i> V12	Retroviraler Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenzkassette; exprimiert H- <i>ras</i> V12 unter der Kontrolle des SV40 early promotor
pBABEzeo	Retroviraler Expressionsvektor mit Zeocin-Resistenzkassette
pBABEzeo-st	Retroviraler Expressionsvektor mit Zeocin-Resistenzkassette; exprimiert das SV40 small t Antigen unter der Kontrolle des SV40 early promotor
pBABEzeo-st1-110	Retroviraler Expressionsvektor mit Zeocin-Resistenzkassette; exprimiert die SV40 small t Antigen-Variante 1-110 unter der Kontrolle des SV40 early promotor

2.9. Kits und spezielle Reagenzien

DNA Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
One-Step RT-PCR-Kit	QIAGEN, Hilden
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Taq Polymerase SuperPak	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TeloTAGGG Telomerase	
PCR ELISA Kit	Roche, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
Zyotmed PCLHRP-100	Zytomed, Berlin

2.10. Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α (*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyr A96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Amplifikation von Derivaten der pBR322-Plasmidfamilie (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe).

2.11. Zelllinien

2.11.1. Erworbene primäre Zellen bzw. Zelllinien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Referenz</u>
A549	Bronchialkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
CaSki	HPV16-positive epitheliale Zervixkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA

GP2-293	humane Nierenepithelzelllinie; exprimiert <i>gag + pol</i> des MMLV; Produzentenzelllinie zur Herstellung retroviraler Vektorpartikel	BD Biosciences, Heidelberg
HaCaT	durch UV-Bestrahlung immortalisierte Hautkeratinozytenzelllinie	zur Verfügung gestellt von Prof. P. Boukamp, DKFZ, Heidelberg
HEK-E6/E7-TRST	humane Nierenepithelzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7, hTERT, H- <i>ras</i> V12 und SV40 st; Resistenzgene: <i>neo</i> , <i>hygro</i> , <i>puro</i> , <i>zeo</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. WC Hahn, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
HeLa	HPV18-positive epitheliale Zervixkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA (Gey et al., 1952)
HFK	primäre Vorhautkeratinozyten	Cambrex/Lonza, Verviers, Belgien
HFK-E6	Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6; Resistenzgen: <i>neo</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. F. Rösl und Prof. H. zur Hausen, DKFZ, Heidelberg
HFK-E7	Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E7; Resistenzgen: <i>neo</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. F. Rösl und Prof. H. zur Hausen, DKFZ, Heidelberg
HFK-E6/E7	Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7; Resistenzgen: <i>neo</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. F. Rösl und Prof. H. zur Hausen, DKFZ, Heidelberg

NHBE	primäre normale humane Bronchialepithelzellen	Cambrex/Lonza, Verviers, Belgien
NHBE-hT-LT	humane Bronchialepithelzelllinie; exprimiert hTERT und SV40 LT; Resistenzgene: <i>hygro</i> und <i>neo</i>	zur Verfügung gestellt von Prof. B. Rollins, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
NHBE-hT-LT-Ras	humane Bronchialepithelzelllinie; exprimiert hTERT, SV40 LT und H- <i>ras</i> V12	zur Verfügung gestellt von Prof. B. Rollins, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
PA317-LXSN-16E6/E7	Mausfibroblastenzelllinie (NIH/3T3-Derivat); Produzentenzelllinie für retrovirale Infektion mit HPV16 E6/E7 (einkloniert in pLXSN)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
PA317-LXSN	Mausfibroblastenzelllinie (NIH/3T3-Derivat); Produzentenzelllinie für retrovirale Infektion mit pLXSN	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
SiHa	HPV16-positive epitheliale Zervixkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
SV-52	Rattensarkomzelllinie; positiv für SV40	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Graessmann, Charité Universitätsmedizin, Berlin

2.11.2. Hergestellte Zelllinien

HFK-LXSN/ K-LXSN	humane Vorhautkeratinozyten; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pLXSN; Resistenzgen: <i>neo</i>
---------------------	---

HFK-E6/E7-Puro	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBABE-puro; Resistenzgene: <i>neo, puro</i>
HFK-E6/E7-Ras	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7 und H- <i>ras</i> V12; Resistenzgene: <i>neo, puro</i>
HFK-E6/E7-Ras-Zeo	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7 und H- <i>ras</i> V12; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBABE-zeo; Resistenzgene: <i>neo, puro, zeo</i>
HFK-E6/E7-Ras-st	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7, H- <i>ras</i> V12, und SV40 st; Resistenzgene: <i>neo, puro, zeo</i>
HFK-E6/E7-Ras-st	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7, H- <i>ras</i> V12, und SV40 st; Resistenzgene: <i>neo, puro, zeo</i>
K-E6/E7	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7; Resistenzgen: <i>neo</i>
K-E6/E7-Puro	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBABE-puro; Resistenzgene: <i>neo, puro</i>
K-E6/E7-Ras	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7 und H- <i>ras</i> V12; Resistenzgene: <i>neo, puro</i>
K-E6/E7-Ras-Zeo	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7 und H- <i>ras</i> V12; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBABE-zeo; Resistenzgene: <i>neo, puro, zeo</i>
K-E6/E7-Ras-st	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7, H- <i>ras</i> V12, und SV40 st; Resistenzgene: <i>neo, puro, zeo</i>

K-E6/E7-Ras-stm	humane Vorhautkeratinozytenzelllinie; exprimiert HPV16 E6/E7, H-rasV12, und SV40 st1-110; Resistenzgene: <i>neo</i> , <i>puro</i> , <i>zeo</i>
NHBE-hT-LT-Ras-Zeo	humane Bronchialepithelzelllinie; exprimiert hTERT, SV40 LT, H-rasV12; transfiziert mit dem retroviralen Vektor pBABE-zeo; Resistenzgene: <i>neo</i> , <i>hygro</i> , <i>puro</i> , <i>zeo</i>
NHBE-hT-LT-Ras-st	humane Bronchialepithelzelllinie; exprimiert hTERT, SV40 LT, H-rasV12 und SV40 st; Resistenzgene: <i>neo</i> , <i>hygro</i> , <i>puro</i> , <i>zeo</i>
NHBE-hT-LT-Ras-stm	humane Bronchialepithelzelllinie; exprimiert hTERT, SV40 LT, H-rasV12 und SV40 st1-110; Resistenzgene: <i>neo</i> , <i>hygro</i> , <i>puro</i> , <i>zeo</i>

2.12. Versuchstiere

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf gemäß §8 Abs. 1 des TShG (G882/06) vor.

Weibliche, 6-8 Wochen alte, immundefiziente NMRI^{nu/nu} Mäuse stammten aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen. Die Tiere wurden unter semisterilen Bedingungen einzeln in Isolierkäfigen mit Streu, Standard-Futterpellets und Wasser *ad libitum* gehalten. Alle Materialien wurden autoklaviert. Die Mäuse unterlagen einem 12-h-Lichtzyklus. Alle Experimente wurden entsprechend den Richtlinien zur Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt.

2.13. Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

Flaschen, Schalen und Platten zur Kultivierung von adhärenenten humanen Zellen wurden von der Firma TPP, Zürich, Schweiz bezogen.

a-MEM (mit Glutamax)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
BEGM	Cambrex/Lonza, Verviers, Belgien
D-MEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg
G418 (Geneticinsulfat)	PAA, Marburg
K-SFM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin G (1000 U/ml)	Grünenthal, Aachen
Puromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reagent Pack Subculture Reagents	Cambrex/Lonza, Verviers, Belgien
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zeocin	Cayla/Invivogen, Toulouse, Frankreich

2.14. Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Hybond-N Nylon-Membran	Amersham Biosciences UK Ltd, Little Chalfont, UK
Hyperfilms	Amersham Biosciences UK Ltd, Little Chalfont, UK
Paraplast	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SuperSignal West Dura Extended	
Duration Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK

2.15. Spezielle Laborgeräte

Autostainer	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Microplate Reader Modell 550	Bio-Rad, München

3. Methoden

3.1. Allgemeine Methoden

Hier nicht gesondert aufgeführte Protokolle zu molekular- und zellbiologischen Methoden wurden dem Laborhandbuch „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Arbeitstechniken, bei denen Kitsysteme benutzt wurden, wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt.

Die Arbeit mit humanen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Materialien wurden bei 121°C und 1 bar autoklaviert; solche mit hitzeempfindlichen Bestandteilen wurden sterilfiltriert.

3.2. Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Mini Kit in Kombination mit dem QIAshredder und dem RNase-free DNase Set (On-Column-Digest) verwendet. Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden der QIAprep Spin Miniprep Kit bzw. der DNA Plasmid Maxi Kit benutzt. Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits isoliert. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits. Alle Kits wurden von der Firma QIAGEN, Hilden bezogen. Qualität, Quantität und Sequenz von DNA-Präparationen wurden anhand von Restriktionsspaltungen, photometrischer Konzentrationsbestimmung, Sequenzspezifischer PCR bzw. (An-)Sequenzieren überprüft. Letzteres wurde von der Firma GATC durchgeführt. Von RNA-Präparationen wurde hingegen lediglich die Konzentration mittels Photometrie ermittelt.

3.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Mullis, *et al.*, 1986)

Die PCR dient der Amplifikation definierter DNA-Bereiche *in vitro*. Hierbei werden zyklisch einzelsträngige DNA-Moleküle durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase zu

Doppelsträngen synthetisiert, sofern kurze Doppelstrangbereiche in den Randregionen als Angriffspunkte für das Enzym zur Verfügung stehen. Diese Doppelstrangbereiche werden durch Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) erzeugt. Für die Herstellung von Oligonukleotiden wurden die Firmen Eurogentec (Aachen) bzw. Metabion (Martinsried) beauftragt.

3.2.2. Reverse Transkriptase – PCR (RT-PCR)

Als RT-PCR bezeichnet man das Übersetzen von RNA in DNA (cDNA) mit anschließender Vervielfältigung definierter Sequenzen *in vitro*. Die cDNA-Synthese wird durch die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, bewerkstelligt. RT-PCRs wurden mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kits (QIAGEN, Hilden) durchgeführt, d. h. cDNA-Synthese und Amplifikation spezifischer Sequenzen erfolgten in einem Ansatz.

3.2.3. Bestimmung von Genexpressionsprofilen mittels Mikroarray

Mikroarray-Analysen wurden im Biochip-Labor am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Zunächst wurde Gesamt-RNA aus den entsprechenden Zelllinien extrahiert. Die RNA wurde unter Verwendung eines monozyklischen Synthesekits (Affymetrix) und oligo-dT-Primern mit einer T7-RNA-Polymerase-Bindestelle in doppelsträngige cDNA umgewandelt. Für die anschließende *in vitro* Herstellung von biotinylierter cRNA wurde der BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit von Affymetrix benutzt. Die markierte cRNA wurde säulenchromatografisch über cRNA Cleanup Columns (Affymetrix) aufgereinigt, fragmentiert und mit dem HG-U133 Plus_2.0 Mikroarray-Chip (Affymetrix) hybridisiert. Es folgten Wasch- und Färbeschritte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Die Arrays wurden mit dem GeneChip Scanner 3000 G7 (Affymetrix) gelesen. Die Daten wurden mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS 5.0; statistischer Algorithmus) ausgewertet. Hierbei wurden die Anwesenheit, Abwesenheit bzw. Stärke der Fluoreszenzsignale für jeden SONDENSATZ determiniert. Die Signale der Experimentalzellen wurden mit denen der Kontrollzellen verglichen, so dass relative Genexpressionsänderungen in Form von „Signal Log2 Ratios“ ermittelt werden konnten. Um eine statistische Signifikanz zu überprüfen, wurden *P*-Änderungswerte basierend auf einem *Wilcoxon Ranking Test* berechnet.

Sondensätze wurden über eine Filteranalyse mit dem Affymetrix Data Mining Tool 3.0 als Zielgene definiert, wenn sie einen „Signal Log2 Ratio“ – Wert >1.32 und einen *P*-Änderungswert $<0,001$ bzw. einen „Signal Log2 Ratio“ – Wert >1.32 und einen *P*-Änderungswert $>0,999$ aufwiesen. Dies entspricht einer 2,5fachen Änderung der Genexpression. Zusätzlich musste für wenigstens einer der zwei Zelllinien, die miteinander verglichen wurden, ein „Present Call“ ausgegeben worden sein.

3.2.4. Quantifizierung der mRNA Expression mittels Taqman Real Time RT-PCR

Um die Expression spezifischer Gene auf RNA-Ebene quantitativ analysieren zu können, wurde eine Taqman Real Time RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA-Extrakt aus den entsprechenden Zellen hergestellt. Je 1 µg RNA wurde in einem 20 µl – Ansatz unter Verwendung des High Capacity cDNA Archive Kits (Applied Biosystems) und eines zufälligen Primermixes in cDNA umgewandelt. Für die Real Time RT-PCR wurden TaqMan^R Gene Expression Assays (Applied Biosystems) unter Standardbedingungen entsprechend der Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des ABI^R PRISM 7900HT Sequence Detection Systems (Applied Biosystems), wobei GAPDH als interne Kontrolle benutzt wurde. Die normalisierten Fluoreszenzsignale der Experimentalzellen wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit denen der Kontrollzellen verglichen. Alle Experimente wurden zweimal als Doppelbestimmungen durchgeführt. Folgende TaqMan^R-Sonden wurden eingesetzt: DCN - Hs00370385_m1, DEFB1 - Hs00608345_m1, IFNK - Hs00737883_m1, LDOC1 - Hs00273392_s1, MGMT - Hs00172470_m1, RERG - Hs00262869_m1, SPRR1B - Hs00824893_m1, THBS2 - Hs00170248_m1, TNFSF10 - Hs00234355_m1, TWIST1 - Hs00361186_m1, WNT4 - Hs00229142_m1, WT1 - Hs00240913_m1.

3.2.5. Karyotypanalyse humaner Zellen (GTG-Färbung)

Die Karyotypisierung humaner Zellen bzw. Zelllinien anhand einer GTG-Färbung wurde in Zusammenarbeit mit dem zytogenetischen Labor von Dr. U. Pascheberg, Laboratoriumsmedizin Dr. Eberhard & Partner, Dortmund vorgenommen. Mit der GTG-Standardfärbemethode nach Babu A. und Verma R.S. (1989) kann jedem in der Metaphase vorliegenden Chromosom ein spezifisches Muster aus hellen und dunklen Banden zugeordnet

werden. Abweichungen von diesem Muster geben z.B Hinweise auf Chromosomenverluste bzw. -vermehrungen, Deletionen, Inversionen oder Fusionsprozesse.

Die zu untersuchenden Zellen wurden bis zur Subkonfluenz in T-25-Zellkulturflaschen angezogen, trypsiniert und mit 0,2 µg/ml Colchizin-Lösung behandelt. Nach 10-minütiger Inkubation mit HEPES-gepufferter Waschlösung bei 37 °C wurden die Zellen mit Eisessig 1:4 verdünnt in Methanol in 3 Stufen fixiert und auf einen Objektträger aufgebracht. Zum Färben wurden die Objektträger zunächst einige Sekunden bis Minuten mit Trypsinlösung bedeckt, mit Sörensen-Puffer, pH 6,5 gewaschen, 20 min in ca. 5-6 %ige Giemsa-Färbelösung getaucht, mit Leitungswasser gespült und schließlich luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

3.3. Analyse von Proteinen

3.3.1. Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus humanen Zellen

Um Gesamtproteinextrakte aus humanen Zellen zu gewinnen, wurden diese in 10 cm – Schalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach Zugabe von 300-450 µl RIPA-Puffer wurden die Zellen mechanisch von der Zellkulturschale gelöst und in ein 1,5-ml-Reagiergefäß gegeben. Der Ansatz wurde während einer 30-minütigen Inkubationsphase auf Eis mehrfach stark geschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 4 °C für 15 min und 14000 Upm sedimentiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reagiergefäß überführt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach der Methode von Bradford *et al.* (1976) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. BSA diente hierbei als Standard.

3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenfraktionierung von Proteinen erfolgte nach der von Laemmli erstmals 1970 beschriebenen Methode, bei der Proteinmoleküle nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Trenn- (Acrylamidkonzentration: 8-15 %; C-Wert: 2,7 %) bzw. Sammelgele (Acrylamidkonzentration: 5 %, C-Wert: 2,7) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Die Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese mit

SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht. Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Gelkammer (Bio-Rad) durchgeführt.

3.3.3. Western Blot

Um spezifische Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden diese im Anschluss an eine Größenfraktionierung (s. 3.3.2) zunächst auf eine Nylonmembran übertragen. Hierzu wurden alle erforderlichen Bestandteile (Polyacrylamidgel, Membran, Whatman-Filterpapier) 5 min mit Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei einer Stromstärke von $1,6 \text{ mA/cm}^2$ mit der Semi-Dry-Blot-Apparatur von Bio-Rad. Die Membran wurde anschließend 10 min mit TBS gewaschen, mindestens 1 h mit TBS-Tween 10 % Milchpulver blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten Primär-Antikörper, welcher 1:1000-1:6000 in TBS-Tween 10 % Milchpulver verdünnt wurde, inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit TBS für jeweils 10 min wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten, 1:50000 in TBS-Tween 0,5 % Milchpulver verdünnten Sekundär-Antikörper behandelt, wiederholt mit TBS gewaschen und mit Peroxidase-Substratlösung nach den Angaben des Herstellers (Pierce) inkubiert. Die durch die Peroxidase erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilms; Amersham) detektiert. Sollten weitere Antikörperreaktionen mit einer Membran durchgeführt werden, wurde diese zu Beginn für 30-45 min bei 70°C mit TBS 2 % Tween 10 % Milchpulver behandelt, um die bereits gebundenen Antikörperkomplexe abzulösen. Danach wurde sie wie oben beschrieben weiterbearbeitet.

3.4. Bestimmung der Telomerase-Aktivität

Die *in vitro* Aktivität der Telomerase wurde mit Hilfe des TeloTAGGG Telomerase PCR-ELISA-Kits der Firma Roche entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Im ersten Schritt verlängert die Telomerase einen Biotin-markierten synthetischen Primer, indem sie an ihn Telomerasequenzwiederholungen anfügt. Im Anschluss werden diese Telomerfragmente in einer PCR amplifiziert. Ein Aliquot der PCR wird denaturiert und mit einer Telomerasequenzspezifischen, Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert. Das entstandene Produkt wird über die Biotin-Markierung an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einem Peroxidase-konjugierten, gegen Digoxigenin gerichteten

Antikörper inkubiert. Die Peroxidase setzt anschließend ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt um, welches mittels eines ELISA-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch detektiert werden kann.

Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen geerntet, aus denen dann der Proteinextrakt gewonnen wurde. Für die PCR wurden 2 µl des Zellextraktes eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde durch Hitzeinaktivierung der vom Hersteller mitgelieferten Positivkontrolle generiert. Es wurden bei jedem Ansatz Doppelbestimmungen durchgeführt. Der gesamte Versuch wurde für jede getestete Zelllinie mindestens einmal wiederholt. Da die absoluten Absorptionswerte einer gewissen Schwankung unterliegen, wurden die Messwerte jeweils zur internen Positivkontrolle in Beziehung gesetzt.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Kultivierung humaner Zellen *in vitro*

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Humane Vorhautkeratinozyten (HFK) und alle davon abgeleiteten Zelllinien wurden in KSF-M kultiviert, welches nach den Angaben des Herstellers mit rekombinantem humanem EGF (epidermal growth factor) und BPE (bovine pituitary extract) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. HEK-E6/E7-TERST Zellen wuchsen in α-MEM-Glutamax plus 10 % FCS (fetal calf serum) und 1 % Penicillin/Steptomycin. PA317-LXSN, PA317-LXSN-16E6/E7, HaCaT, HeLa, SiHa und CaSki Zellen wurden in D-MEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin angezogen. GP2-293 Zellen wurden in D-MEM unter Zusatz von 1 mM Natriumpyruvat, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. NHBE- und alle davon abgeleitete Zelllinien wuchsen in BEGM versetzt mit den vom Hersteller mitgelieferten Supplementen sowie 1 % Penicillin/Streptomycin.

Alle in D-MEM (mit oder ohne Natriumpyruvat) kultivierten Zelllinien wurden zum Splitten bei subkonfluenter Dichte mit PBS gewaschen, dann mit VT-Lösung bedeckt und nach dem Ablösen der Zellen in D-MEM (mit oder ohne Natriumpyruvat) resuspendiert. Der gewünschte Volumenanteil wurde erneut ausgesät. Für alle übrigen Zellen und Zelllinien wurde das Reagent Pack Subkultivierungssystem von Cambrex/Lonza benutzt. Die Zellen wurden mit HBSS-Lösung gewaschen und mit Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin mit TNS-Lösung neutralisiert. Die Zellen wurden

sedimentiert, im entsprechenden Medium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis gesplittet.

3.5.2. Bestimmung des *in vitro* Wachstumsverhaltens von humanen Zellen

Zum Erstellen von *in vitro* Wachstumskurven wurde die Verdopplungsrate einer Zellpopulation berechnet. Hierzu wurden die Zellen in T-75-Zellkulturflaschen bis zur Subkonfluenz kultiviert, trypsinisiert und ausgezählt. In der Regel wurden 5×10^5 Zellen erneut ausgesät und wiederum bis zur Subkonfluenz angezogen. Die Verdopplungsrate pro Passage (PDpp) wurde nach der Formel $\log_2(\text{Gesamtzellzahl/ausgesäte Zellzahl})$ berechnet. Für die Ermittlung der kumulativen Verdopplungsrate (PDcum) wurden alle PDpp addiert.

3.5.3. Herstellung stabiler humaner Zelllinien mittels retroviraler Infektion

Um eine stabile ektope Expression der viralen bzw. zellulären Onkogene HPV16 E6/E7, H-RasV12 und SV40 small t zu erreichen, wurden die entsprechenden Gene (HPV16 E6/E7 und SV40 st) bzw. cDNA (H-rasV12) mittels retroviraler Infektion in humane Vorhautkeratinozyten bzw. humane Bronchialepithelzellen eingebracht. Die Technik der retroviralen Infektion macht sich die Eigenschaft von Retroviren zunutze, mit Hilfe ihres enzymatischen Repertoires und spezifischer genomischer Sequenzen in die DNA ihrer Wirtszellen integrieren zu können. Ein entsprechender retroviraler Expressionsvektor enthält statt der Virus-spezifischen Gene *gag*, *pol* und *env* das Zielgen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und einen Selektionsmarker. In der Regel kodiert ein zweiter Vektor für ein virales *env*-Gen, wodurch die Wirtsspezifität beeinflusst werden kann. Eine dazugehörige Verpackungs- oder Produzentenzelllinie besitzt die viralen Gene *gag* und *pol* stabil in ihrem Genom integriert. Nach Transfektion der beiden Vektoren in die Verpackungszelllinie werden von dieser infektiöse, replikations-inkompetente retrovirale Partikel gebildet und in das umgebende Medium abgegeben, welches dann zur Infektion der gewünschten Zielzellen benutzt wird. Die Selektion positiver Klone erfolgt zumeist durch die Gabe eines Antibiotikums.

Da die Methode für nahezu jeden retroviralen Vektor und jede Zelllinie neu etabliert werden musste, wird die Verfahrensweise im Folgenden für jede hergestellte Zelllinie im Einzelnen erläutert. Generell unterscheidet sich das Protokoll für die Transfektion mit den retroviralen

Vektoren pLXSN und pLXSN-16E6/E7 von allen anderen Transfektionen, da hierfür jeweils eine Verpackungszelllinie zur Verfügung stand, die direkt retrovirale Partikel in das sie umgebende Medium abgibt (PA317-LXSN bzw. PA317-LXSN-16E6/E7; entwickelt von DA Galloway; bezogen von ATCC, Manassas, VA, USA; Referenz: Halbert *et al.*, 1991). Für alle übrigen Transfektionen wurde das BD Retropack System (BD Biosciences) benutzt. Hierbei wurde die von humanen HEK-293 Zellen abstammende Verpackungszelllinie GP2-293 mittels Kalziumphosphatpräzipitation mit dem entsprechenden retroviralen Expressionsvektor, ein pBABE-Derivat, zusammen mit dem die Wirtsspezifität determinierenden p10A1-Vektor transfiziert. Die Zielzellen wurden dann mit den von der Verpackungszelllinie produzierten retroviralen Partikeln infiziert. Alle pBABE-Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. W.C. Hahn, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA bzw. Prof. R.A. Weinberg, Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Boston, MA, USA entweder direkt oder über die Internetplattform Addgene (www.addgene.com) zur Verfügung gestellt. Bevor sie für eine retrovirale Infektion eingesetzt wurden, wurden alle Vektoren durch Kontrollspaltungen mit geeigneten Restriktionsenzymen sowie Ansequenzieren auf ihre Korrektheit hin überprüft. Das Ansequenzieren wurde von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

3.5.3.1. HFK-LXSN/K-LXSN und K-E6/E7

Die entsprechende Produzentenzelllinie PA317-LXSN bzw. PA317-16E6/E7 wurde zunächst in einer T-75-Zellkulturflasche bis zu einer 60-70 %igen Dichte in D-MEM angezogen und dann 1,5 Tage in 8 ml K-SFM kultiviert. Das Virus-haltige Medium wurde kurz zentrifugiert, sterilfiltriert, mit 4 µg/ml Polybrene versetzt und auf die primären Vorhautkeratinozyten gegeben, welche eine Zelldichte von 70-80 % Konfluenz aufwiesen. Nach 4-6 h wurden 4 ml K-SFM zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Virus-haltige Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium 2 Tage kultiviert. Wenn nötig wurden die Zellen in dieser Phase gesplittet. Anschließend wurden die Zellen für 7-10 Tage mit K-SFM plus 50 µg/ml G418 behandelt und ggf. gesplittet. G418-resistente Klone wurden vereinigt und als HFK-LXSN/K-LXSN bzw. K-E6/E7, Passage 0 bezeichnet.

3.5.3.2. HFK-E6/E7-Puro

Je 5 µl der auf 1 µg/µl verdünnten Plasmid-DNA von pBABE-puro und p10A1 wurden gemischt, mit 490 µl 0,25 M CaCl₂ und anschließend mit 500 µl BES-Puffer versetzt und nach ca. 25-minütiger Inkubation auf GP2-293 Zellen getropft, welche zu 50 %iger Konfluenz in einer 10 cm – Schale vorlagen. Nach ca. 7,5 h wurden die Zellen 1 Mal mit PBS gewaschen und für ca. 24 h mit 7 ml K-SFM kultiviert. Der Virusstock wurde kurz zentrifugiert, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. HFK-E7/E7 wurden bis zu einer Dichte von 70 % in T-75-Flaschen angezogen und mit Virusstock plus 4 µg/ml Polybrene inkubiert. Nach 7 h wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und für ca. 48 h mit 12 ml K-SFM kultiviert. Während dieser Phase wurden die Zellen 1:2 gesplittet. Positive Klone wurden nach 11-tägiger Selektion mit K-SFM, welches 0,5 µg/ml Puromycin enthielt, vereinigt und mit HFK-E6/E7-Puro, Passage 0 benannt.

3.5.3.3. HFK-E6/E7-Ras, K-E6/E7-Puro, K-E6/E7-Ras

Die Verpackungszelllinie GP2-293 wurde in D-MEM_{pyr} (D-MEM plus 1 mM Natriumpyruvat) bis zu einer ca. 60 %igen Dichte in 10 cm – Schalen angezogen. Je 5 µl der Plasmide pBABE-puro bzw. pBABE-puro-HRasV12 wurden mit dem Plasmid p10A1 zusammengegeben (Konzentration jeweils 1 µg/µl), dann mit 490 µl einer 0,25 M CaCl₂-Lösung und anschließend mit 500 µl BES-Puffer gemischt. Der Ansatz wurde 15-20 min inkubiert und tropfenweise auf die GP2-293-Zellen gegeben, während diese leicht geschwenkt wurden. Nach ca. 6 h wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden 2 Mal mit PBS gewaschen und dann für ca. 24 h in 7 ml D-MEM_{pyr} + K-SFM (1:1 gemischt) kultiviert. Das Virus-haltige Medium zweier 10 cm – Schalen wurde vereinigt, kurz zentrifugiert, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Die Zielzellen HFK-E6/E7 bzw. K-E6/E7 wurden in T-75-Zellkulturflaschen bis zu einer 60 %igen Konfluenz angezogen und mit dem Virusstock plus 4 µg/ml Polybrene versetzt. Nach ca. 8 h wurde das Virus-haltige Mischmedium durch 12 ml K-SFM ersetzt. Nach ca. 48 h wurden die Zellen für 10 Tage mit 0,5 µg/ml Puromycin in K-SFM behandelt. Puromycin-resistente Klone wurden ggf. vereinigt und als Passage 0 definiert.

3.5.3.4. HFK-E6/E7-Ras-Zeo

Die Plasmide pBABE-zeo, pBABE-zeo-st1-110 und p10A1 wurden jeweils auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. 5 µl des entsprechenden pBABE-Derivats und 5 µl des p10A1-Vektors wurden gemischt, mit 490 µl einer 0,25 M CaCl₂-Lösung und anschließend mit 500 µl BES-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 10-20 min inkubiert und auf die GP2-293-Zellen getropft, welche in 10 cm - Schalen bis zu einer ca. 30 %igen Dichte in D-MEM_{pyr} angezogen worden waren. Nach 6-7 h wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und in 8 ml D-MEM_{pyr} für weitere 16-18 h kultiviert. Im Anschluss wurden die Viruspartikel für 24-26 h in 5 ml eines 1:2-Gemisches aus D-MEM_{pyr} und K-SFM gesammelt. Das Virus-haltige Medium zweier 10 cm – Schalen wurde vereinigt, kurz zentrifugiert, sterilfiltriert und bis zur Infektion der Zielzellen bei -80 °C gelagert. HFK-E6/E7-Ras bzw. K-E6/E7-Ras Zellen wurden bis zu einer 50 %igen Dichte in T-75-Zellkulturflaschen angezogen und mit Virusstock plus 4 µg/ml Polybrene für 8-8,5 h inkubiert. Der Virusstock wurde entfernt und durch K-SFM ersetzt. Nach einer ca. 48-stündigen Erholungszeit wurden die Zellen einer 2-tägigen Selektionsphase mit 500 µg/ml Zeocin in K-SFM unterzogen. Im Fall von HFK-E6/E7-Ras-Zeo folgte eine weitere Erholungspause von etwa 48 Stunden ohne Antibiotikum, bevor erneut für 2 Tage mit 500 µg/ml Zeocin selektiert wurde. Zeocin-resistente Klone wurden als Mischpopulation weiter kultiviert.

3.5.3.5. K-E6/E7-Ras-Zeo#2.2, K-E6/E7-Ras-st#1.4, K-E6/E7-Ras-stm#4.2, HFK-E6/E7-Ras-st#7.2, HFK-E6/E7-Ras-st#7.5, HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4 und HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4,

Je 5 µg des entsprechenden pBABE-Derivats (pBABE-zeo-st1-110, pBABE-zeo-st, pBABE-zeo) wurden mit 5 µg p10A1-Plasmid im 10 µl – Ansatz gemischt, mit 490 µl einer 0,25 M CaCl₂-Lösung sowie 500 µl BES-Puffer versetzt und 15-20 min inkubiert. Der DNA-Kalziumphosphat-Mix wurde tropfenweise auf 10 cm – Schalen mit ca. 30 % konfluenten GP2-293 Zellen gegeben. Nach ca. 6 h wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und für etwa 16 h in D-MEM_{pyr} kultiviert, bevor sie mit einem Gemisch aus 2,5 ml D-MEM und 2,5 ml K-SFM bedeckt wurden. Nach ca. 24 h wurde der Mediumsüberstand kurz zentrifugiert, sterilfiltriert und mit 4 µg/ml Polybrene versetzt. Je 2 ml des Virusstocks wurden eingesetzt, um die entsprechenden Zielzellen zu infizieren, welche in etwa 60-70 %iger Dichte in 6-

Loch-Platten vorlagen. Nach ca. 8 h wurde das Virus-haltige Mischmedium durch 2 ml K-SFM ersetzt. Im Anschluss an eine etwa 48-stündige Erholungsphase wurden die Zellen einer zumeist mehrstufigen Selektion mit 350-400 µg/ml Zeocin unterzogen, d. h. sie wurden für 1-2 Tage unter Zusatz von Antibiotikum und anschließend 1-3 Tage ohne Antibiotikum kultiviert. Ggf. wurden die Zellen ein zweites bzw. drittes Mal für 1-2 Tage mit Antibiotikum kultiviert. Zeocin-resistente Klone, die in einer Vertiefung heranwuchsen, wurden als polyklonale Kultur erhalten.

3.5.3.6. NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4, NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 und NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.4

Die polyklonalen Zelllinien NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1, NHBE-hT-LT-Ras-st#1 und NHBE-hT-LT-Ras-stm#1 wurden wie unter 3.4.4.6 beschrieben generiert. Allerdings wurde BEGM statt K-SFM verwendet. Darüber hinaus erfolgte die Selektion mit 500 µg/ml Zeocin in 2 Stufen: NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1 sowie NHBE-hT-LT-Ras-st#1 wurden zunächst für 2 Tage mit Antibiotikum, danach 3 Tage ohne Antibiotikum und schließlich 2 Tage mit Antibiotikum kultiviert, wohingegen NHBE-hT-LT-Ras-stm#1 für 2 Tage mit Antibiotikum, anschließend 1 Tag ohne Antibiotikum und dann weitere 7 Tage mit Antibiotikum kultiviert wurden.

3.6. Tumorigenitätsassays

3.6.1. Softagarassay/Kolonieformationsassay

Maligne Transformierte Zellen besitzen die Eigenschaft, unabhängig von einer festen Verankerungsmatrix (z. B. dem Boden eines Zellkulturgefäßes) wachsen zu können. Um Zellen auf diese Fähigkeit hin zu testen, wurde ein Softagarassay durchgeführt. Hierzu wurde in einer 5 cm – Schale eine zweischichtige Agarmatrix hergestellt. Die untere Schicht bestand aus dem entsprechenden Medium plus 0,6 % Noble-Agar (Difco/BD Biosciences). Die obere Schicht setzte sich aus Medium plus 0,3 % Noble-Agar vermischt mit den zu untersuchenden Zellen in definierter Zellzahl (2×10^5 Zellen) zusammen. Die Zellen erhielten nach 1,5

Wochen 500 µl frisches Medium. Nach 3 Wochen wurden alle Kolonien, die größer waren als 0,2 mm, im Lichtmikroskop ausgezählt. Bei großer Koloniedichte wurden 8 repräsentative Felder (je 5 x 5 mm) ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. Die Koloniebildung wurde zudem mittels digitaler Bildaufnahme dokumentiert.

3.6.2. Test auf Tumorigenität durch Injektion in immundefiziente Mäuse

Um zu überprüfen, ob Zellen tumorigene Eigenschaften *in vivo* besitzen, wurden diese subkutan in beide Flanken weiblicher, 6-8 Wochen alter, immundefizienter Nacktmäuse injiziert. Hierzu wurden jeweils 5×10^6 Zellen in 100 µl PBS resuspendiert, mit 100 µl Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg) gemischt und eingespritzt. Für einige Versuche wurden die Mäuse vor der Injektion für ca. 25 min mit γ -Strahlen bei einer Dosis von 5 Gy behandelt. Die Tiere wurden mindestens einmal wöchentlich auf Tumorbildung hin überprüft. Tumore wurden ggf. mit einem digitalen Meßschieber ausgemessen. Mäuse, die einen Tumor entwickelten, wurden spätestens bei einer Tumorgöße von 1 cm im Durchmesser getötet. Tumor-negative Tiere wurden nach drei Monaten getötet. Das Tumolvolumen in cm^3 wurde nach der Formel $\frac{4}{3}\pi r^3$ (r = Radius) berechnet.

3.7. Histologische Untersuchungen

Alle histologischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Tötsch vom Institut für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

3.7.1. Herstellung von Paraffinschnitten

Für histologische Untersuchungen wurde frisch entnommenes Tumorgewebe über Nacht in 4%iger Formaldehydlösung (Formalin) fixiert und anschließend maschinell nach folgendem Programm unter Vakuum eingebettet: 1. erneute Fixierung in Formalinlösung bei 30°C (1 x 30 min, 1 x 110 min), 2. schrittweise Dehydrierung in Ethanol bei 30°C (70% Ethanol: 45 min; 96% Ethanol: 2 x 55 min, 100% Ethanol: 1 x 35 min, 1 x 110 min; Xylol: 2 x 30 min, 1 x 110 min), 3. finale Einbettung in Paraplast bei 60°C (1 x 30 min, 2 x 35 min, 1 x 55 min).

Nach der Einbettung wurden maschinelle Dünnschnitte (2-4 µm) hergestellt und auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht.

Adhärente Zellen wurden trypsiniert, abzentrifugiert und über Nacht in Formalinlösung fixiert. Nach der Entfernung des Formalins, wurde das Zellpellet in einer 2%igen Agaroselösung eingebettet. Nach der Aushärtung der Agaroseblöcke erfolgten alle weiteren Schritte nach dem für Tumorgewebe beschriebenen Programm, allerdings ohne nochmalige Fixierung in Formalinlösung und mit 50% Ethanol als Startpunkt für die Alkoholreihe.

3.7.2. HE-Färbung von Gewebeschnitten und adhären Zellen

Zur Klassifizierung einzelner Zelltypen in Tumorgewebe bzw. zur zytologischen Differenzierung von Zellorganellen in einzelnen Zellen wurde eine maschinelle Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (HE) an entsprechenden Paraffinschnitten (s.o.) durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte zunächst durch Inkubation in Alkohol absteigender Konzentrationen (1 min Xylol, 1 min 100% Ethanol, 45 sek 96% Ethanol, 45 sek 70% Ethanol, 30 sek. fließend wässern) entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate 3 min mit Hämatoxylinlösung gefärbt, 6 min fließend gewässert, 3 min mit Eosinlösung gegengefärbt und 45 sek fließend gewässert. Nach einer schrittweisen Inkubation in Alkohol aufsteigender Konzentrationen (45 sek 70% Ethanol, 45 sek 96% Ethanol, 1 min 100% Ethanol, 1 min Xylol) wurden die Präparate eingedeckt.

3.7.3. Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Um das Expressionsmuster von CIP2A *in situ* zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte von Tumorgeweben bzw. adhären humanen Zellen einer immunhistochemischen Färbung mit einem CIP2A-spezifischen Antikörper unterzogen. Hierzu wurden die entparaffinierten Präparate (vgl. 3.7.2) zunächst mit Citratpuffer demaskiert, 3 x 5 min mit PBS gewaschen, zur Blockierung der endogenen Peroxidase 5 min mit 5 % Wasserstoffperoxid behandelt und erneut gewaschen. Die weiteren Schritte, d.h. Blockierung, Antikörperbindung und Visualisierung erfolgten maschinell im Autostainer (Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark) unter Verwendung des Zytomed PCLHRP-100 Kitsystems der Firma Zytomed, Berlin, entsprechend den Angaben des Herstellers. Der anti-CIP2A-Antikörper wurde hierbei in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Zur Färbung wurde DAB (3 min), zur Gegenfärbung

Mayer's Hämalaun (30 sek) benutzt. Die Präparate wurden bis zur gewünschten Blaufärbung in Leitungswasser gespült, entwässert (2 x 10 sek 70% Ethanol, 2 x 10 sek 96% Ethanol, 2 x 10 sek 100% Ethanol, 3 x Xylol) und abschließend eingedeckt. Um die Antikörperspezifität zu überprüfen, wurde ein Präparat ohne Inkubation mit dem Primär-Antikörper gefärbt. Als Positivkontrolle dienten Paraffinschnitte eines Magenkarzinoms.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung HPV16 E6-, E7 und E6/E7-positiver humaner Vorhautkeratinozyten: Überprüfung von immortalen bzw. tumorigenen Eigenschaften nach Langzeitkultivierung unter *in vitro* Bedingungen

Die Vorhautkeratinozyten-Zelllinien HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden freundlicherweise von Prof. F. Rösl und Prof. H. zur Hausen (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten aufgrund einer retroviralen Transfektion mit pLXSN-Derivaten das genomische Material des humanen Papillomvirus Typ 16, welches die viralen Gene E6 (HFK-E6), E7 (HFK-E7) bzw. E6 und E7 (HFK-E6/E7) kodiert. HPV16 E6/E7-positive humane Keratinozyten eignen sich als Modell für HPV16-assoziierte zervikale intraepitheliale Neoplasien. Derartige Läsionen treten allerdings im Allgemeinen erst lange nach der Primärinfektion mit dem Papillomvirus auf. Um sich dieser *in vivo* Situation im Zellkulturmodell anzunähern, wurden die Zellen längere Zeit in Kultur gehalten (Passage 25-50), bevor die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt wurden. Als Kontrollzellen wurden primäre bzw. mit dem retroviralen Leervektor pLXSN transfizierte Vorhautkeratinozyten (HFK bzw. HFK-LXSN), eine HPV-negative, mittels UV-Bestrahlung immortalisierte Hautkeratinozytenzelllinie (HaCaT; zur Verfügung gestellt von Prof. P. Boukamp; DKFZ, Heidelberg) sowie zwei HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinien (SiHa und CaSki) verwendet.

4.1.1. Verifizierung der Expression der viralen Gene in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 nach Langzeitkultivierung unter *in vitro* Bedingungen

Um die Stabilität der Expression der viralen Gene unter Langzeitkulturbedingungen zu überprüfen, wurde zunächst Gesamt-mRNA aus den jeweiligen Zellen isoliert und eine RT-PCR mit HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-spezifischen Primern durchgeführt. Wie der **Abb. 5A** zu entnehmen ist, konnte die erwartete virale mRNA-Expression in allen Zellen verifiziert werden.

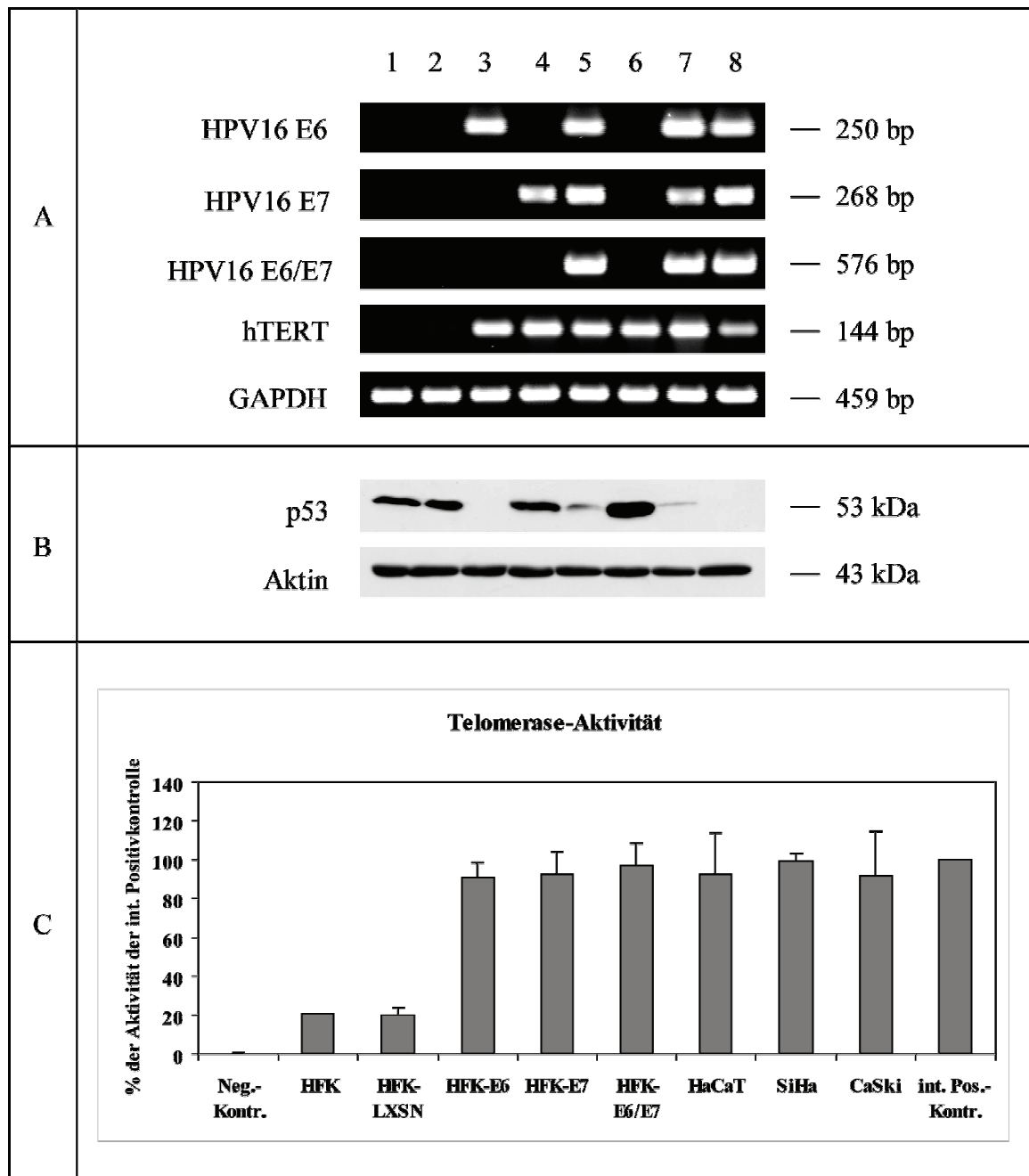


Abb. 5 Verifizierung der Expression und Aktivität der HPV-Onkogene E6 und E7 in den Zelllinien HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7.

(A) Die mRNA-Expression von HPV16 E6, E7 bzw. E6/E7 sowie hTERT wurde mit Hilfe Transkript-spezifischer Primer in einer RT-PCR überprüft. Es wurde 1 µg Gesamt-RNA-Extrakt pro Reaktion eingesetzt. Eine RT-PCR für GAPDH wurde durchgeführt, um einheitliche Mengen an RNA in den PCR-Ansätzen zu gewährleisten. Primäre HFK, pLXSN-transfizierte HFK und HaCaT-Zellen dienen als Negativkontrollen, SiHa- und CaSki-Zellen als Positivkontrollen. 1) HFK, 2) HFK-LXSN, 3) HFK-E6, 4) HFK-E7, 5) HFK-E6/E7, 6) HaCaT, 7) SiHa, 8) CaSki (B) Die Funktionalität des E6-Proteins wurde über dessen Fähigkeit, die Degradation des p53-Proteins induzieren zu können, nachgewiesen. Die p53-Proteinexpression wurde mittels Western blot-Analyse unter Verwendung eines p53-spezifischen Antikörpers untersucht. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Detektion von Aktin diente der Überprüfung einheitlicher Proteinmengen. HaCaT-Zellen wurden als Positivkontrolle für die Antikörperbindung verwendet, SiHa- und CaSki-Zellen dienten als Vergleichszelllinien. Reihenfolge der Proben wie bei A. (C) Die Telomerase-Aktivität wurde anhand eines PCR ELISA Kits (Roche) bestimmt. Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen bzw. 2 µl der mitgelieferten internen Positivkontrolle (int. Pos.-Kontr.) und Negativkontrolle (Neg.-Kontr.) eingesetzt. SiHa und CaSki dienten als Vergleichszelllinien. Die Absorptionswerte wurden zur internen Positivkontrolle prozentual in Relation gesetzt.

Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit doppelten Reaktionsansätzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Des Weiteren sollten die viralen Proteine anhand von Western Blot Analysen mit HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-spezifischen Antikörpern in Gesamtproteinextrakten nachgewiesen werden. Allerdings ergaben Western Blot Analysen mit aus SiHa- und CaSki-Zellen isolierten Proteinen keine detektierbare Bindung der verwendeten Antikörper (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Expression und Aktivität des E6-Proteins indirekt durch Überprüfung der p53-Proteinexpression verifiziert. Es ist bekannt, dass das E6-Protein hochonkogener HPV-Typen nach Bindung an p53 eine proteasomale Degradation dieses Tumorsuppressorproteins induziert (Scheffner *et al.*, 1990). Entsprechend zeigten, wie in **Abb. 5B** zu sehen, alle HPV16 E6-positiven Keratinozytenzelllinien eine verminderte p53-Proteinexpression im Vergleich zu den primären bzw. Leervektor-transfizierten Keratinozyten. HaCaT-Zellen tragen eine Mutation im p53-Gen, welche in einer Stabilisierung des p53-Proteins resultiert. Daher dienten die HaCaT-Zellen als Positivkontrolle für die Detektion des p53-Proteins. Eine Überprüfung der Funktionalität des E7-Proteins anhand eines Vergleichs der Rb-Proteinexpression zwischen Primärkeratinozyten und HPV16 E7-mRNA-exprimierenden Keratinozyten war nicht möglich, da bereits primäre HFK und HFK-LXSN keine nachweisbare Rb-Proteinexpression in der Western blot-Analyse zeigten (ohne Abb.).

4.1.2. Analyse der Expression von hTERT und der Telomerase-Aktivität in HPV16 E6-, E7, und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten

Ein wichtiger Schritt im Immortalisierungs- bzw. Transformationsprozess humaner Zellen ist die Stabilisierung der Telomere. Zumeist wird dies durch die Aktivierung des Enzyms Telomerase erreicht. Um den Status der Telomerase-Aktivität in den HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten zu ermitteln, wurde daher die Expression der katalytischen Telomerase-Untereinheit hTERT mittels RT-PCR sowie die Telomerase-Aktivität anhand eines ELISA-basierenden TRAP-Assays untersucht. Wie der **Abb. 5C** zu entnehmen ist, konnte sowohl in HFK-E6, HFK-E7 als auch HFK-E6/E7 eine starke mRNA-Expression für hTERT ähnlich der als Positivkontrolle verwendeten Zervixkarzinomzelllinie SiHa festgestellt werden. Für die primären Zellen HFK und HFK-LXSN konnte demgegenüber erwartungsgemäß nur eine geringe hTERT-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Analog dazu zeigten die HFK-E6-, HFK-E7- und HFK-E6/E7

gegenüber den primären HFK und der Leervektorkontrolle eine deutlich erhöhte Telomerase-Aktivität vergleichbar der der Positivkontrolle SiHa. Für die ebenfalls als Positivkontrolle herangezogene Zervixkarzinomzelllinie CaSki wurde zunächst eine schwächere hTERT-mRNA-Expression detektiert; der TRAP-ELISA ergab jedoch eine vergleichsweise starke Telomerase-Aktivität. Für spätere Versuche wurden allerdings sowohl für Analysen der hTERT mRNA-Expression als auch für Telomerase-Aktivitätsmessungen ausschließlich SiHa-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt.

4.1.3. Ermittlung chromosomaler Veränderungen in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten

Chromosomale Instabilität ist ein zentrales Charakteristikum humaner Tumorzellen. Darüber hinaus weisen auch manche immortale Zellen chromosomale Aberrationen auf. Um den Karyotyp der HPV16 E6-, E7- und E6/E7-exprimierenden humanen Vorhautkeratinozyten im Vergleich zu den Primärkeratinozyten mit bzw. ohne Leervektor zu analysieren, wurden ihre Metaphase-Chromosomen mit der GTG-Methode angefärbt und unter dem Mikroskop auf chromosomale Anomalien hin untersucht. Die Karyotyp-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. U. Pascheberg von der Laboratoriumsmedizin Dr. Eberhard und Partner, Dortmund.

Wie erwartet ergab sich für die primären HFK mit bzw. ohne Leervektor ein normaler männlicher Karyotyp. Im Gegensatz dazu konnten für die HPV16 E6-, E7- sowie E6/E7-positiven HFK diverse chromosomale Veränderungen festgestellt werden. In ihren Metaphasen konnten zwischen 44 und 48 Chromosomen nachgewiesen werden. In den 30 analysierten Metaphasen von HFK-E6 lagen durchgängig ein q-terminal verlängertes Chromosom 8, ein überzähliges Chromosom 9 mit einer Deletion am kurzen Arm sowie ein deletiertes Chromosom 13 vor. Des Weiteren fanden sich in 29 Metaphasen eine Monosomie von Chromosom 18, in 26 Metaphasen eine Trisomie von Chromosom 5, in 14 Metaphasen eine Monosomie von Chromosom 22 und in 11 Metaphasen ein nicht näher bestimmbares Markerchromosom.

In den 20 untersuchten Metaphasen von HFK-E7 ließ sich als durchgängige Veränderung eine Translokation der vollständigen Chromosomen 7 und 8 sowie eine Translokation der Chromosomen 1 und 21 feststellen. Erstere führte zu einer Trisomie von Chromosom 8, letztere induzierte eine partielle Trisomie für den langen Arm von Chromosom 1. Daneben lag in 16 Metaphasen eine Monosomie für Chromosom 22 und in 6 Metaphasen eine

Trisomie für Chromosom 20 vor. Schließlich konnte für jeweils 2 Metaphasen ein p-terminal verlängertes Chromosom 14, eine Monosomie für Chromosom 15, eine Monosomie für Chromosom 16 sowie eine fragliche Deletion am langen Arm von Chromosom 5 nachgewiesen werden.

Von HFK-E6/E7 wurden 24 Metaphasen untersucht. Hierbei ergab sich als durchgängige Veränderung eine Translokation der Chromosomen 7 und 10, welche in einer Monosomie für den kurzen Arm von Chromosom 10 und eine Trisomie für den kurzen Arm von Chromosom 7 resultierte. Darüber hinaus fanden sich in 22 Metaphasen eine Trisomie von Chromosom 11, in 9 Metaphasen eine Monosomie von Chromosom 17 sowie in 4 Metaphasen eine Deletion am langen Arm von Chromosom 7.

Es konnten demnach mit Ausnahme der Monosomie für Chromosom 22, die sowohl in HFK-E6 als auch HFK-E7 vorlag, keine übereinstimmenden chromosomalen Veränderungen in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 beobachtet werden. Auch wies keine der HPV16 E6-, E7, bzw. E6/E7-exprimierenden Vorhautkeratinozyten-Zelllinien eine zytogenetische Veränderung auf, die von anderen mit der Überwindung der zellulären Seneszenz in Verbindung gebracht wurde, wie z.B. der Verlust von Chromosomenbereichen auf 3p oder 9p (Reznikoff *et al.*, 1994, Vieten *et al.*, 1998). In **Tab. 2** sind die Chromosomenbefunde zusammengefasst dargestellt, **Abb. 6** zeigt exemplarisch für jede Zelllinie ein Karyogramm.

Tab. 2 Karyotypanalyse von HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten.

Zelllinie	Karyotyp
HFK/ HFK-LXSN	46, XY (normaler männlicher Karyotyp)
HFK-E6	45-47,X,+5,add(8)(q24),+del(9)(p13),del(13)(q14),-18,-22,+mar[cp30]
HFK-E7	44-47,XY,+?del(5)(q13),dic(7;8)(p22;p23),add(14)(p11),-15,-16,der(21)t(1;21)(q21;p11),+20,-22[cp20]
HFK-E6/E7	45-48,X,del(7)(q31),der(10)t(7;10)(p10;p10),+11,-17,+20[cp24]

Mindestens 20 Metaphasen der Zelllinien HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 sowie der primären HFK mit und ohne pLXSN-Leervektor wurden mittels GTG-Färbung auf chromosomale Veränderungen hin untersucht.

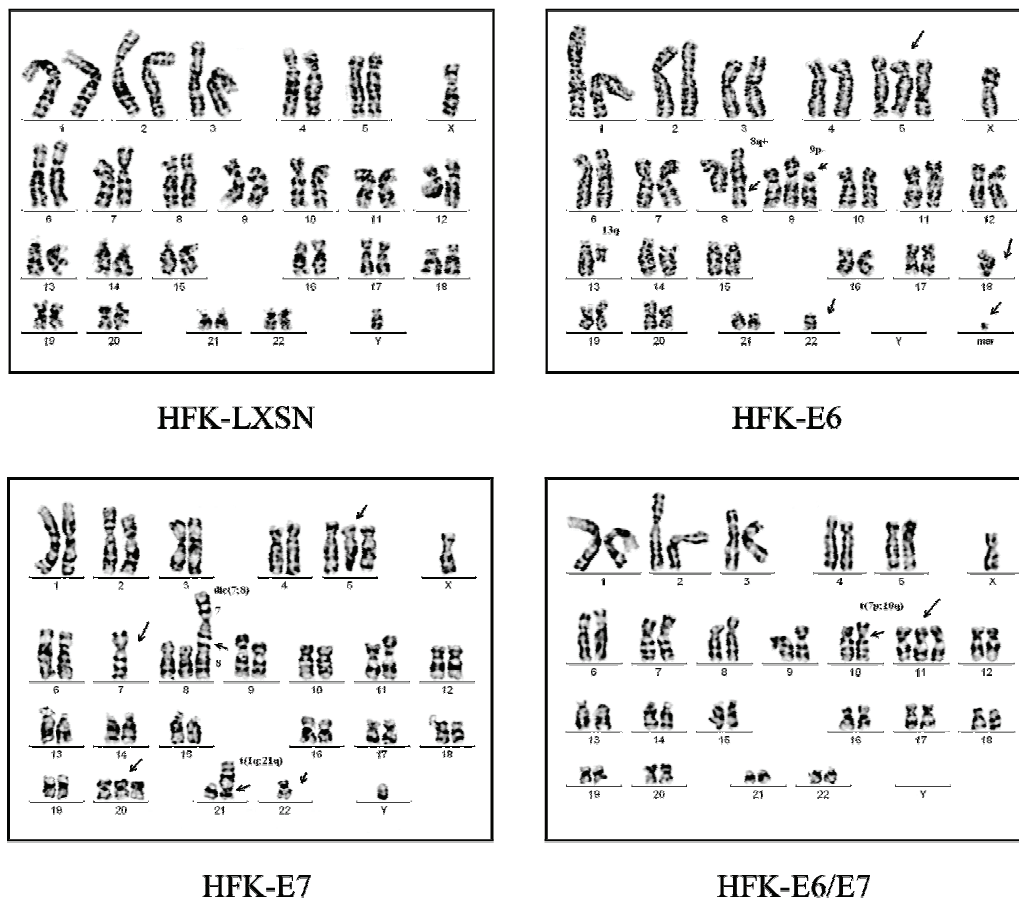


Abb. 6 Zytogenetische Alterationen in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-exprimierenden humanen Vorhautkeratinozyten.

Dargestellt sind mittels GTG-Färbung ermittelte, repräsentative Karyogramme für HFK-LXSN, HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7. Pfeile weisen auf gehäuft aufgetretene chromosomale Aberrationen hin. Es wurden mind. 20 Metaphasen untersucht.

4.1.4. *In vitro* Wachstum langzeitkultivierter, HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-exprimierender humaner Vorhautkeratinozyten

Immortale Zellen zeichnen sich durch ein unbegrenztes Wachstum aus. Um das *in vitro* Wachstumsverhalten HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiver humaner Vorhautkeratinozyten zu untersuchen, wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten die Populationsverdopplungen pro Passage ermittelt und aufsummiert. Die sich daraus ergebenden Wachstumskurven sind in **Abb. 7** dargestellt. Für alle Zelllinien konnte eine konstante Wachstumsrate beobachtet werden. Auffallend war allerdings, dass die HFK-E6/E7-Zellen ein etwas langsames Wachstum in Zellkultur zeigten als die Keratinozyten, die nur eines der beiden Onkogene exprimierten.

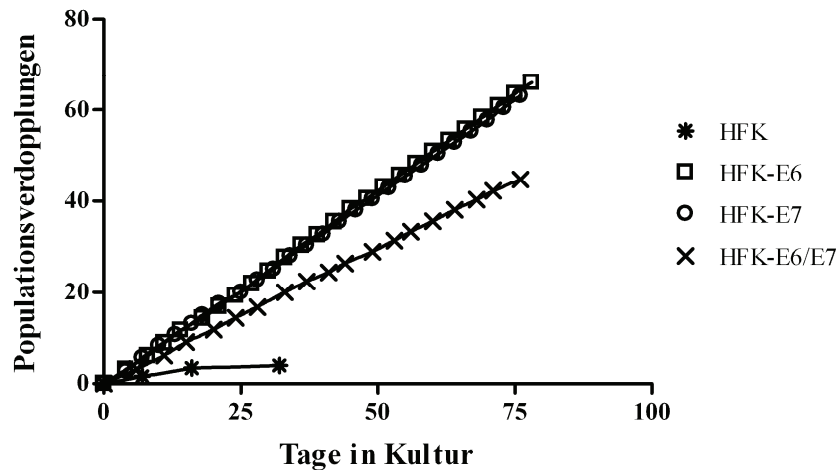


Abb. 7 Wachstumsverhalten der Zelllinien HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 unter *in vitro* – Bedingungen.

Gezeigt sind die Populationsverdopplungen von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 in Zellkultur über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen. Im Vergleich dazu ist das *in vitro* Wachstum von primären HFK repräsentativ für Vorhautkeratinozyten mit und ohne pLXSN-Leervektor dargestellt.

4.1.5. *In vivo* Wachstum von HPV16-E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten nach Langzeitkultivierung unter *in vitro* Bedingungen

Um zu überprüfen, ob sich nach Langzeitkultivierung von HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-exprimierenden humanen Vorhautkeratinozyten unter *in vivo* Bedingungen eventuell tumorigene Klone entwickeln würden, wurden jeweils 5×10^6 Zellen zusammen mit Matrigel subkutan in die Flanken von 6-8 Wochen alten, weiblichen Nacktmäusen injiziert. Während die Mäuse, denen die Zervixkarzinomzelllinien SiHa und CaSki gespritzt wurden, innerhalb von 4-6 Wochen 1 cm große Tumore ausbildeten, konnte bei den Tieren, denen die primären HFK mit oder ohne Leervektor bzw. die HPV16 E6-, E7- sowie E6/E7-positiven HFK injiziert wurden, auch nach drei Monaten keine Tumorentstehung beobachtet werden (ohne Abb).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass langzeitkultivierte humane Vorhautkeratinozyten, die die HPV16-Onkogene E6 und/oder E7 exprimieren, durch diverse chromosomale Veränderungen gekennzeichnet sind, unbegrenzt unter *in vitro* Bedingungen wachsen, jedoch keine Tumorbildung in immundefizienten Nacktmäusen nach subkutaner Injektion induzieren.

4.2. Analyse der differentiellen Genexpression von HPV16 E6-, E7- und E6/E7- positiven, immortalen humanen Keratinozyten

Das Vorhandensein der viralen Proteine E6 und E7 humaner Papillomviren bewirkt eine modulierte Expression verschiedener zellulärer Gene. Dies ermöglicht dem Virus eine produktive Replikation bei gleichzeitiger Unterdrückung der zellulären Immunabwehr. In manchen Fällen kann eine persistierende Infektion mit hochonkogenen Papillomviren allerdings auch zu einer malignen Entartung der Wirtszellen führen. Eine Veränderung normaler epithelialer Zellen hin zu einem malignen Phänotyp verläuft stufenweise. Je nach Schweregrad unterscheidet man z.B. beim Zervixkarzinom verschiedene histologisch differenzierbare neoplastische Entwicklungsstadien (CINI-III). Im Fall von HPV-assoziierten zervikalen Neoplasien und Tumoren wurde festgestellt, dass die Expression der viralen Gene E6 und E7 eine essentielle Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des tumorigenen Phänotyps spielt. Humane Keratinozyten, welche die E6- und E7-Gene hochonkogener HPV-Typen wie HPV16 exprimieren, eignen sich daher als Modell für intraepitheliale Neoplasien. Genexpressionsstudien an diesen Zellen konnten bereits zur Aufklärung diverser Aspekte der Virus-Wirts-Interaktion beitragen, die für die HPV-assoziierte Tumorentstehung von Bedeutung sind. Eine Identifizierung differentiell exprimierter Gene in HPV16 E6/E7-positiven epithelialen Zellen könnte zudem zur Etablierung neuer diagnostischer Marker und somit einer genaueren Klassifizierung von Tumorsubtypen führen, was wiederum die Entwicklung neuartiger individueller Therapieansätze ermöglichen würde. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Mikroarray-Analyse an humanen Vorhautkeratinozyten durchgeführt werden, die nach retroviraler Transfektion stabil die viralen Gene E6 und E7 von HPV16 exprimierten. Um zu ermitteln, welches der beiden viralen Onkogene möglicherweise für die Modulation der zellulären Genexpression verantwortlich ist, wurden zudem HFK, die entweder nur HPV16 E6 oder HPV16 E7 exprimierten, ebenfalls einer Mikroarray-Analyse unterzogen. Einige der in den Mikroarray-Analysen identifizierten differentiell exprimierten Gene wurden anschließend mittels quantitativer Real Time RT-PCR verifiziert. Gegebenenfalls sollten zudem Genexpressionsunterschiede auf Proteinebene im Western Blot bzw. immunhistochemisch an zervikalem neoplastischem Gewebe untersucht werden, um die Eignung der identifizierten Gene als potenzielle diagnostische Marker zu überprüfen.

4.2.1. Erstellung eines Genexpressionsprofils von HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten mit Hilfe von Mikroarrays

Um differenziell exprimierte zelluläre Gene in Abhängigkeit von der Expression der viralen HPV16-Onkogene E6, E7 bzw. E6/E7 zu ermitteln, wurde Gesamt-RNA aus den Zelllinien HFK-E6, HFK-E7, HFK-E6/E7 sowie HFK-LXSN isoliert. Die gewonnene RNA wurde in cDNA und anschließend in biotinylierte cRNA umgewandelt. Diese wurde säulenchromatografisch aufgereinigt, fragmentiert und mit HG-U133 Plus_2.0 Mikroarray Chips der Firma Affymetrix hybridisiert. Die gefärbten Chips wurden gescannt und mit der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software ausgewertet. Die Signale von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden mit denen von HFK-LXSN in Beziehung gesetzt. Eine veränderte Genexpression wurde mathematisch in Form von Signal Log2 Ratios (SLR) ausgegeben. Zudem wurde die statistische Signifikanz anhand eines Wilcoxon-Ranking-Tests unter Berechnung von P-Werten überprüft. Die Daten wurden mit Hilfe des Affymetrix Data Mining Tool 3.0 gefiltert. Sondensets wurden als Zielgene definiert, wenn sie eine SLR von $>1,32$ und einen P-Wert von $<0,001$ (erhöhte Genexpression) bzw. eine SLR von $<-1,32$ und einen P-Wert von $>0,999$ (verringerte Genexpression) aufwiesen. Dies entspricht einer statistisch signifikanten 2,5fachen Veränderung der Genexpression. Zusätzlich sollte in mindestens einer der in Relation gesetzten Zelllinien ein *present call* ermittelt worden sein.

Sondensets, zu denen keine Annotierung existierte, gingen nicht in die Auswertung ein. Wurden zu einem Gen mehrere Sondensets ermittelt, die übereinstimmend ein bestimmtes Genexpressionsmuster zeigten, wurde ein repräsentatives Sondenset für die Endauswertung ausgewählt. Im Gegensatz dazu wurde ein durch mehrere Sondensets vertretenes Gen bei einem widersprüchlichen Genexpressionsmuster aus der auszuwertenden Gesamtliste entfernt. Auf diese Weise wurden 3434 Gene identifiziert, die in mindestens einer der HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Keratinozytenzelllinien im Vergleich zur Leervektorkontrolle differenziell exprimiert wurden. Die Gesamtheit der Mikroarray-Daten kann unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo> (GSE14051) eingesehen werden.

Um zu ermitteln, welche funktionell zusammengehörenden Gene am häufigsten in mindestens einer der HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Keratinozytenzelllinien gegenüber den HFK-LXSN differenziell exprimiert sind, wurde eine Gostat-Analyse mit dem entsprechenden Gostat-Programm von Affymetrix durchgeführt. Wie der **Abb. 8** entnommen werden kann, wiesen insbesondere solche Gene eine modulierte Expression auf, deren Produkte an der Entwicklung und Differenzierung von (epidermalen) Zellen, an Ablauf und

Regulation des Zellzyklus bzw der Zellproliferation, an Immunreaktionen bzw. Inflammationsprozessen sowie der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind.

Tab. 3 zeigt ausgewählte Beispiele der in HFK-E6, HFK-E7 bzw. HFK-E6/E7 gegenüber HFK-LXSN differenziell exprimierten Gene. Zur besseren Übersicht wurden die Gene aufgrund ihrer hauptsächlichen zellulären Funktion zu verschiedenen Gruppen (Zellzyklus, Zellwachstum/Zellproliferation, Zelldifferenzierung/zelluläre Entwicklung, Immunantwort, Angiogenese, Apoptose, Reaktion auf DNA-Schädigung) zusammengefasst. Gene, deren verändertes Genexpressionsmuster mittels quantitativer Real Time RT-PCR verifiziert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.2), sind fettgedruckt.

Wie bereits in der Gostat-Analyse angedeutet, kodieren viele der in HPV16 E6, E7 und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten gegenüber der Leervektorkontrolle runterregulierten Gene für Proteine, die bei der Differenzierung von Keratinozyten eine Rolle spielen, darunter *involucrin*, *keratin 16*, *decorin*, *filaggrin*, *growth differentiation factor 15*, *paired box gene 6* und *8*. Auch Gene, deren Produkte eine Immunantwort (z.B. *interferon kappa*, *interferon gamma receptor 1*, *interleukin 1 alpha and beta*, *interleukin 8*, *interleukin receptor beta*, *defensin beta 1*, *CXCL5*, *TNF superfamily member 9* und *11*) oder Apoptose (z.B. *BCL2 ligand 11*, *caspase recruitment domain family member 6* und *15*, *ICEBERG*, *programmed cell death protein 4* und *5*, *serine/threonine kinase 4* und *17A*, *TNF superfamily member 10*) induzieren, waren in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 im Vergleich zu HFK-LXSN vielfach in ihrer Expression vermindert. Gene, die für Proteine kodieren, die einen positiven Einfluss auf Angiogeneseprozesse haben (*endothelin 1*, *neuropilin 1* und *2*, *thrombospondin 2*, *vascular endothelial growth factor* usw.), waren in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-exprimierenden Vorhautkeratinozyten gegenüber der Leervektorkontrolle in der Mehrzahl ebenfalls runterreguliert. Im Gegensatz dazu waren Gene, deren Produkte an der Zellzyklusprogression beteiligt sind (*cyclin A1*, *A2*, *B1*, *B2*, und *F*, *CDC2*, *CDC25*, *CDK2*, *E2F* etc.) in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven Keratinozyten verglichen mit HFK-LXSN vielfach in ihrer Expression erhöht.

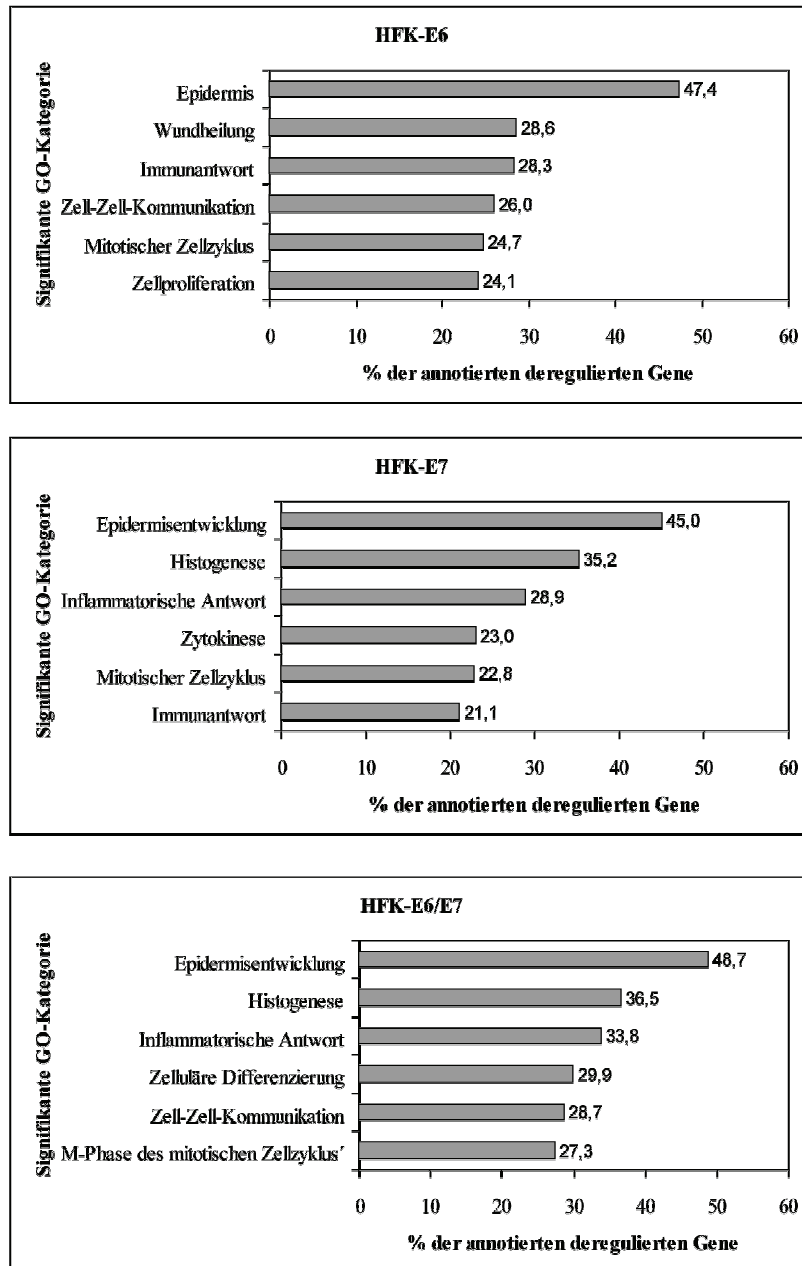


Abb. 8 Statistische Analyse der Mikroarray-Daten: Häufigkeitsverteilung funktionell zusammengehörender, in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten differenziell exprimierter Gene.

Mit Hilfe des Gostat-Programms (Affymetrix) wurden die funktionell zusammengehörenden Gengruppen ermittelt, die am häufigsten in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 gegenüber HFK-LXSN differenziell exprimiert waren.

Tab. 3 Genexpressionsprofil von HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten

UniGene ID	Gensymbol	Genname	Chromos. Lokal.	HFK-E6 vs. HFK-LXSN	Signal Log Ratio HFK-E7 vs. HFK-LXSN	HFK-E6/E7 vs. HFK-LXSN
Zellzyklus						
Hs.442658	AURKB	aurora kinase B	chr17p13.1	2,72	2,02	2,04
Hs.417050	CCNA1	cyclin A1	chr13q12.3-q13	2,81		2,86
Hs.85137	CCNA2	cyclin A2	chr4q25-q31	2,3	1,68	1,41
Hs.23960	CCNB1	cyclin B1	chr5q12	3,63	2,9	3,19
Hs.194698	CCNB2	cyclin B2	chr15q22.2	3,23	2,44	2,74
Hs.1973	CCNF	cyclin F	chr16p13.3	2,32	1,35	1,64
Hs.13291	CCNG2	cyclin G2	chr4q21.1	1,97	1,9	1,76
Hs.334562	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	chr10q21.1		1,88	
Hs.524947	CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	chr1p34.1	2,6	2,13	1,78
Hs.153752	CDC25B	cell division cycle 25B	chr20p13		2,12	1,6
Hs.656	CDC25C	cell division cycle 25C	chr5q31	4,08	2,17	3,2
Hs.19192	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	chr12q13			1,36
Hs.370771	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	chr6p21.2	-1,51		-1,43
Hs.512599	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16, Ink4a)	chr9p21	3,86	5,01	5
Hs.75573	CENPE	centromere protein E, 312kDa	chr4q24-q25	3,16	2,58	2,73
Hs.497741	CENPF	centromere protein F, 350/400 kDa (mitosin)	chr1q32-q41	3,82	3,29	3,16
Hs.82919	CUL2	cullin 2	chr10p11.21			-1,86
Hs.471873	DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	chr2q37.3	1,59		

Hs.445758	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	chr8q21.2	1,69	
Hs.416375	E2F7	E2F transcription factor 7	chr12q21.2	1,42	
Hs.8878	KIF11	kinesin family member 11	chr10q24.1	1,55	1,65
Hs.307529	KIF15	kinesin family member 15	chr3p21.31	1,95	2,62
Hs.119324	KIF22	kinesin family member 22	chr16p11.2		1,33
Hs.270845	KIF23	kinesin family member 23	chr15q23		1,88
Hs.69360	KIF2C	kinesin family member 2C	chr1p34.1	2,09	2,4
Hs.438720	MCM7	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	chr7q21.3-q22.1		1,54
Hs.437582	MCM8	minichromosome maintenance deficient 8 (S. cerevisiae)	chr20p12.3	1,51	
Hs.153704	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	chr1q32.2-q41	2,84	2,53
Hs.329989	PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	chr16p12.1	3,04	2,91
Hs.172052	PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	chr4q27-q28		1,47
Hs.23348	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	chr5p13		2,06
Hs.250822	STK6	serine/threonine kinase 6	chr20q13.2-q13.3	2,41	2,92
Hs.169840	TTK	TTK protein kinase	chr6q13-q21		1,56
Hs.369762	TYMS	thymidylate synthetase	chr18p11.32	1,8	1,59
Zellwachstum, Zellproliferation					
Hs.270833	AREG	amphiregulin	chr4q13-q21	-3,1	-2,14
Hs.419815	EGF	epidermal growth factor	chr4q25		5,79
Hs.488293	EGFR	epidermal growth factor receptor	chr7p12	2,11	2,01
Hs.115263	EREG	epiregulin	chr4q13.3	2,02	
Hs.208124	ESR1	estrogen receptor 1	chr6q25.1		-2,33
Hs.284244	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	chr4q26-q27	1,43	2,3
Hs.1690	FGFBP1	fibroblast growth factor binding	chr4p16-p15		-1,64

Hs.533683	FGFR2	protein 1	chr10q26			
Hs.75678	FOSB	fibroblast growth factor receptor 2"	chr19q13.32	2	-2,89	2,48
Hs.322852	GAS2L1	oncogene homolog B	chr22q12.2			-1,56
Hs.799	HBEGF	growth arrest-specific 2 like 1	chr5q23			-2,12
Hs.462998	IGFBP4	heparin-binding EGF-like growth factor	chr17q12-q21.1	-4,33		
Hs.274313	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 4	chr12q13		1,35	1,75
Hs.479808	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 6	chr4q12		-4,83	
Hs.525704	JUN	insulin-like growth factor 7	chr1p32-p31			1,66
Hs.275464	KLK10	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	chr19q13.3-q13.4	-6,24	-2,14	-2,41
Hs.82045	MDK	Kallikrein 10	chr11p11.2	-1,44		
Hs.468908	MXD1	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	chr2p13-p12	-1,47		
Hs.179718	MYBL2	MAX dimerization protein 1	chr20q13.1	2,55		1,85
Hs.376032	PDGFA	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	chr7p22	1,39	1,91	2,04
Hs.444975	PLAGL1	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	chr6q24-q25	-3,92	-9,49	-5,29
Hs.531704	PRKCA	pleiomorphic adenoma gene-like 1	chr17q22-q23.2		-1,74	-2,05
Hs.498570	PRKCQ	protein kinase C, alpha	chr10p15	-2,18		-2,06
Hs.199487	REERG	protein kinase C, theta	chr12p12.3	5,08		8,8
Hs.46320	SPRR1A	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	chr1q21-q22	-5,06	-3,09	-4,25
Hs.1076	SPRR1B	small proline-rich protein 1A	chr1q21-q22	-4,85	-1,93	-3,41
Hs.231622	SPRR2B	small proline-rich protein 1B (cornifin)	chr1q21-q22	-7,43	-5,36	-7,14
		small proline-rich protein 2B				

Hs.2421	SPRR2C	small proline-rich protein 2C	chr1q21-q22	-4,05	-2,67	-1,46
Hs.490253	SPRR2G	small proline-rich protein 2G	chr1q21-q22	-4,34	-4,56	-3,85
Hs.490253	SPRR3	small proline-rich protein 3	chr1q21-q22	-8,55	-6,66	-6,76
Hs.371720	SYK	spleen tyrosine kinase	chr9q22	-5,84		-5,07
Hs.170009	TGFA	transforming growth factor, alpha	chr2p13	-1,95		-1,58
Hs.133379	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	chr1q41		-1,35	
Hs.369397	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	chr5q31	2,66	2,41	2,39
Hs.36761	HRASLS	HRAS-like suppressor	chr3q29	4,7	4,7	5,26
Differenzierung, Entwicklung						
Hs.533336	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	chr10p12.3-p11.2			-1,76
Hs.193163	BIN1	bridging integrator 1	chr2q14		-3,05	-2,25
Hs.156316	DCN	decorin	chr12q21.33			7,87
Hs.292156	DKK3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	chr11p15.2			1,81
Hs.502306	EHF	ets homologous factor	chr11p12	-4,9		-2,75
Hs.147279	EOMES	eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	chr3p21.3-p21.2		3,05	
Hs.116651	EVA1	epithelial V-like antigen 1	chr11q24	-2,04	-1,88	-1,67
Hs.531478	FLG	filaggrin	chr1q21.3	-6,51	-6,96	-5,2
Hs.504281	FLI1	Friend leukemia virus integration 1	chr11q24.1-q24.3		4,73	
Hs.159234	FOXE1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	chr9q22			1,84
Hs.462214	GAS7	growth arrest-specific 7	chr17p13.1	-2,97	-1,34	
Hs.515258	GDF15	growth differentiation factor 15	chr19p13.1-13.2		1,72	
Hs.516439	IVL	involucrin	chr1q21	-7,3	-5,78	-6,52
Hs.50915	KLK5	kallikrein 5	chr19q13.3-q13.4	-6,59	-2,43	-5,71
Hs.79361	KLK6	kallikrein 6 (neurosin, zyme)	chr19q13.3	-2,64	-3,42	-3,16
Hs.151254	KLK7	kallikrein 7 (chymotryptic,	chr19q13.41	-7,27	-5,12	-5,61

Hs.411572	KLK12	stratum corneum)	chr19q13.3-q13.4	-3,34
Hs.371139	KRT4	kallikrein 12	chr12q12-q13	-2,04
Hs.463032	KRT13	keratin 4	chr17q12-q21.2	-2,04
Hs.432448	KRT16	keratin 13	chr17q12-q21	-3,82
Hs.520119	MDFI	keratin 16	chr6p21	-1,88
Hs.132966	MET	MyoD family inhibitor		
		met proto-oncogene (hepatocyte		
		growth factor receptor)	chr7q31	1,79
Hs.154057	MMP19	matrix metalloproteinase 19	chr12q14	-4,32
Hs.8546	NOTCH3	Notch homolog 3 (Drosophila)	chr19p13.2-p13.1	-3,7
Hs.502235	PAX6	Paired box gene 6 (aniridia, keratitis)	chr11p13	
Hs.469728	PAX8	Paired box gene 8	chr2q12-q14	-4,3
Hs.252451	SEMA3A	semaphorin 3A	chr7p12.1	1,36
Hs.528721	SEMA3E	semaphorin 3E	chr7q21.11	-4,54
Hs.514913	SERPINB2	serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	chr18q21.3	4,44
				-2,61
Hs.138202	SERPINB7	serine proteinase inhibitor, clade B, member 7	chr18q21.33	-2,7
Hs.54416	SIX1	sine oculis homeobox homolog 1 (Drosophila)	chr14q23.1	3,88
Hs.97849	SIX4	sine oculis homeobox homolog 4 (Drosophila)	chr14q23	2,53
Hs.111779	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	chr5q31.3-q32	2,89
		T-box 1		
Hs.173984	TBX1	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	chr22q11.21	1,78
Hs.445884	WNT3		chr17q21	
Hs.25766	WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 44	chr1p36.23-p35.1	6,45
Hs.152213	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	chr3p21-p14	-1,41
Hs.121540	WNT10A	Wingless-type MMTV integration	chr2q35	1,83

Hs.408453	WT1	site family, member 10A Wilms tumor 1	chr11p13	5,62	5,17
Immunantwort					
Hs.444049	BLNK	B-cell linker complement component 1, s subcomponent	chr10q23.2-q23.33	-1,96	-2,12
Hs.458355	C1S		chr12p13		3,57
Hs.2161	C5R1	complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	chr19q13.3-q13.4	3,83	3,05
Hs.310512	CCR1L1	chemokine (C-C motif) receptor- like 1	chr3q22	-5,2	-2,75
Hs.1799	CD1D	CD1D antigen, d polypeptide	chr1q22-q23 chr6q21	-1,89 -4,24	-2,71
Hs.375108	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)			
Hs.472860	CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	chr20q12-q13.2	-3,63	
Hs.128065	CTSC	cathepsin C	chr11q14.1-q14.3	-1,88	
Hs.89714	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	chr4q12-q13	-1,5	
Hs.32949	DEFB1	defensin, beta 1	chr8p23.2-p23.1	-4,9	-6,85
Hs.283082	DEFB103A	defensin, beta 103A	chr8p23	-1,46	
Hs.203717	FN1	fibronectin 1	chr2q34	1,6	4,47
Hs.458485	G1P2	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	chr1p36.33	1,41	-1,71
Hs.523847	G1P3	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	chr1p35	1,46	-3,2
Hs.532634	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	chr14q32	2,63	-7,24
Hs.82316	IFI44	interferon-induced protein 44	chr1p31.1	2,15	-2,43
Hs.458414	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	chr11p15.5	1,38	-2,84

Hs.520414	IFNGR1	interferon gamma receptor 1	chr6q23-q24		-2,48	-1,49
Hs.551550	IFNK	interferon, kappa	---	-7,23	1,62	-8,85
Hs.469521	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	chr2q12	-2,9	-3,8	-3,84
Hs.1722	IL1A	interleukin 1, alpha	chr2q14			-2,2
Hs.126256	IL1B	interleukin 1, beta	chr2q14	-2,42		-2,31
Hs.516301	IL1F5	interleukin 1 family, member 5	chr2q14	-4,11	-3,1	-4,51
Hs.211238	IL1F9	interleukin 1 family, member 9	chr2q12-q21	-3,76	-1,95	-2,83
Hs.25333	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	chr2q12-q22			-2,34
Hs.66	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	chr2q12	-4	-2,14	-1,62
Hs.624	IL8	interleukin 8	chr4q13-q21	-3,96		
Hs.846	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	chr2q35	-1,66		
Hs.517307	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	chr21q22.3	-2,83	1,35	-5,05
Hs.926	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	chr21q22.3	-4,12		-4,16
Hs.82116	MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	chr3p22	-1,95	-1,76	-2,03
Hs.524760	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	chr12q24.1	-2,8		-2,58
Hs.521989	PDCD1LG1	CD274 antigen	chr9p24	-3,38		-2,45
Hs.58356	PGLYRP4	peptidoglycan recognition protein 4	chr1q21		-4,52	
Hs.525206	RNASE7	RNase A family, 7	chr14q11.2	-3,74		-2,26
Hs.19413	S100A12	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	chr1q21	-2,54	-2,5	-1,57
Hs.546296	SECTM1	secreted and transmembrane 1	chr17q25		2,52	
Hs.123035	SERPINB4	serine proteinase inhibitor, clade B, member 4	chr18q21.3	-4,98	-5,69	-1,35
Hs.1524	TNFSF9	TNF (ligand) superfamily, member 9	chr19p13.3	-2,44		-2,57
Hs.333791	TNFSF11	TNF (ligand) superfamily, member 11	chr13q14	4,36		
Hs.283022	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	chr6p21.1	-3,17	-3,56	

Hs.501778	TRIM22	tripartite motif-containing 22	chr11p15	-2,85	-2,46
Angiogenesis					
Hs.369675	ANGPT1	angiopoietin 1	chr8q22.3-q23		1,42
Hs.546251	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet -derived)	chr22q13 22q13.33		-1,77
Hs.506423	EDN1	endothelin 1	chr6p24.1	-2,54	-2,05
Hs.183713	EDNRA	endothelin receptor type A	chr4q31.22-q31.23	-2,26	-3,05
Hs.479756	KDR	kinase insert domain receptor	chr4q11-q12		4,72
Hs.131704	NRP1	neuropilin 1	chr10p12		-3,47
Hs.471200	NRP2	neuropilin 2	chr2q33.3		-1,64
Hs.252820	PGF	placental growth factor	chr14q24-q31	-1,83	1,87
Hs.371147	THBS2	thrombospondin 2	chr6q27	-2,52	-4,62
Hs.73793	VEGF	vascular endothelial growth factor	chr6p12		-2,4
Apoptose					
Hs.469658	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	chr2q13	1,64	1,88
Hs.127799	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	chr11q22	2,4	
Hs.514527	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	chr17q25	3,23	3,04
Hs.131226	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	chr8p21	-1,5	
Hs.553613	BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like	chr1q21.2	-4,25	-3,33
Hs.135201	CARD15	caspase recruitment domain family, member 15	chr16q21	-3,13	-2,96
Hs.200242	CARD6	caspase recruitment domain family, member 6	chr5p13.1	-2,62	

Hs.551527	DATF1	death associated transcription factor 1	chr20q13.33	1,4		2,08
Hs.135507	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	chr14q13.1	-2,74	-3,49	-2,71
Hs.135665	GAS2	growth arrest-specific 2	chr11p14.3-p15.2			3,15
Hs.386189	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	chr22q13.2-q13.3	2,28	1,61	
Hs.470887	GULP1	engulfment adaptor PTB domain containing 1	chr2q32.3-q33	-1,38	-3,57	-1,71
Hs.56279	ICEBERG	ICEBERG caspase-1 inhibitor	chr11q21-q22	-3,27	-2,63	-3,05
Hs.45231	LDOC1	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	chrXq27	-6,44		
Hs.279819	MAGEH1	melanoma antigen family H, 1	chrXp11.22	-4,52	-2,9	-3,22
Hs.180566	MALT1	MALT lymphoma translocation gene 1	chr18q21	-2,39		
Hs.104305	NALP1	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 1	chr17p13.2	-3,01		
Hs.369279	NALP2	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 2	chr19q13.42	-6,76		
Hs.160953	P53AIP1	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1	chr11q24		-2,21	-1,93
Hs.232543	PDCD4	programmed cell death 4	chr10q24	1,82		2,41
Hs.443831	PDCD5	Programmed cell death 5	chr19q12-q13.1		-1,73	
Hs.268887	STK17A	Serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	chr7p12-p14			1,77
Hs.472838	STK4	serine/threonine kinase 4	chr20q11.2-q13.2			1,75
Hs.462529	TNFRSF25	TNF receptor superfamily, member 25	chr1p36.2	-1,65		-1,69
Hs.478275	TNFSF10	TNF (ligand) superfamily, member 10	chr3q26	-3,19	-1,74	-7,77
Hs.516826	TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	chr20p13-p12.2	-1,68		-1,77

Reaktion auf DNA-Schädigung

Hs.435561	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	chr11q22-q23		2,18
Hs.208388	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	chr3p26	2,38	2,15
Hs.434953	HMGB2	high-mobility group box 2	chr4q31	1,79	1,83
Hs.166091	LIG4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	chr13q33-q34		-1,73
Hs.501522	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	chr10q26	-5,97	
Hs.192649	MRE11A	meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	chr11q21		1,72
Hs.405467	NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	chr4q34.3	2,62	1,78
Hs.534331	NUDT1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1	chr7p22	2,06	2,05
Hs.552577	RAD52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	chr12p13-p12.2	3,13	4,31
Hs.97794	RAD9B	RAD9 homolog B (S. cerevisiae)	chr12q24.11	2,27	1,81
Hs.487540	RPA3	replication protein A3	chr7p22	2,08	2
Hs.241407	SERPINB13	serine proteinase inhibitor, clade B, member 13	chr18q21.3-q22	-2,71	-2,4
Hs.523718	SFN	stratifin (14-3-3 sigma)	chr1p36.11		-1,99
Hs.119684	TNFRSF10C	TNF receptor superfamily, member 10c	chr8p22-p21	-3,15	-2,04
Hs.550494	TP53I11	tumor protein p53 inducible protein 11	chr11p11.2	-4,87	
Hs.192132	TP73	tumor protein p73	chr1p36.3		2,91

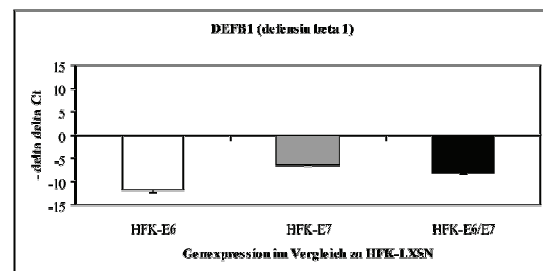
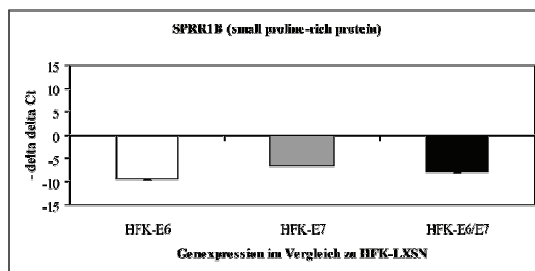
Aus den Zelllinien HFK-LXSN, HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurde Gesamt-RNA extrahiert und in cDNA bzw. biotinylierte cRNA umgewandelt, welche fragmentiert und mit dem Affymetrix-Genchip HG-U133_Plus2.0 hybridisiert wurde. Mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software ausgewerteten Fluoreszenzsignale von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden zu denen von HFK-LXSN in Beziehung gesetzt. Paare, bei denen mindestens ein present call ermittelt wurde und deren Signal Log Ratios (SLR) einen statistisch signifikanten Wert $< -1,32$ bzw. $> 1,32$ aufwiesen, gingen in die finale Auswertung ein. Die Liste zeigt eine nach funktioneller Zugehörigkeit sortierte Auswahl an in HFK-E6, HFK-E7- bzw. HFK-E6/E7 gegenüber der Leervektorkontrolle differenziell exprimierten Genen.

4.2.2. Verifizierung der veränderten Expression ausgesuchter Gene durch quantitative Real Time RT-PCR

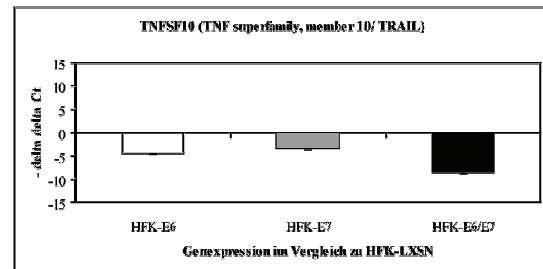
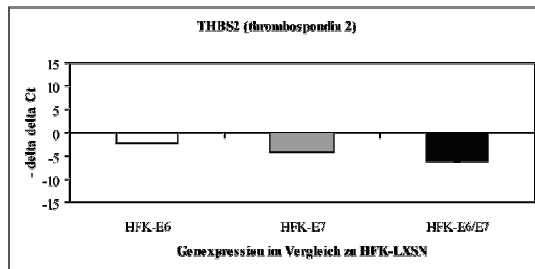
Um die Mikroarray-Daten zu verifizieren, wurde das Expressionsmuster einiger in der Mikroarray-Analyse identifizierter Gene mittels quantitativer Real Time RT-PCR überprüft. Hierzu wurde wiederum Gesamt-RNA aus den Zelllinien HFK-LXSN, HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 isoliert, in cDNA umgewandelt und für eine Real Time RT-PCR unter Verwendung von Gen-spezifischen Taqman Real Time Assays unter Standardbedingungen eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem ABI^R PRISM 7900HT Sequence Detection System ausgewertet, wobei GAPDH als endogene Kontrolle diente. Die normalisierten Fluoreszenzsignale von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zu denen der Leervektorkontrolle in Relation gesetzt und als Signal Log₂ Ratios ausgegeben. Alle Real Time RT-PCRs wurden zweimal in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden insbesondere Gene überprüft, deren zelluläre Funktion einen Zusammenhang mit der Entstehung HPV-vermittelter Neoplasien nahelegte, wie z.B. solche, deren Produkte an der zellulären Differenzierung oder an der Immunabwehr beteiligt sind. Des Weiteren waren Gene von Interesse, von denen bereits eine Assoziation mit anderen Tumorerkrankungen vermutet oder nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurden vor allem Gene ausgewählt, deren Expression in der Mikroarray-Analyse deutlich erhöht oder erniedrigt war. Dieser Ansatz machte eine starke differenzielle Genexpression wahrscheinlich und sollte zudem falsch-positive Kandidaten möglichst ausschließen. Insgesamt wurden 12 Gene auf ihr Expressionsmuster in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 verglichen mit HFK-LXSN mittels Real Time RT-PCR überprüft: *DCN* (*decorin*), *DEFB1* (*defensin beta 1*), *IFNK* (*interferon kappa*), *LDOC1* (*leucine zipper, downregulated in cancer*), *MGMT* (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), *RERG* (*ras-like, estrogen-regulated growth inhibitor*), *SPRR1B* (*small proline rich protein 1B*), *THBS2* (*thrombospondin 2*), *TNFSF10/TRAIL* (*TNF superfamily, member 10; TRAIL*), *TWIST1* (*twist homolog 1*), *WNT4* (*WNT family, member 4*), *WT1* (*Wilm's tumor 1*).

Abb. 9A zeigt die Genexpression von *SPRR1B* (*small proline rich protein 1B*), welches für einen Keratinozytendifferenzierungsmarker kodiert, und *DEFB1* (*defensin beta 1*), welches für ein antimikrobielles Peptid kodiert. Beide Gene waren in allen HPV16 E6- und/oder E7-exprimierenden Keratinozyten im Vergleich zur Leervektorkontrolle deutlich runterreguliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die HPV16 Onkogene E6 und E7 unabhängig voneinander an der verminderten Expression dieser beiden Gene beteiligt sind.

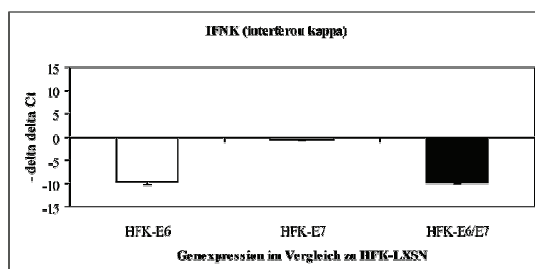
A



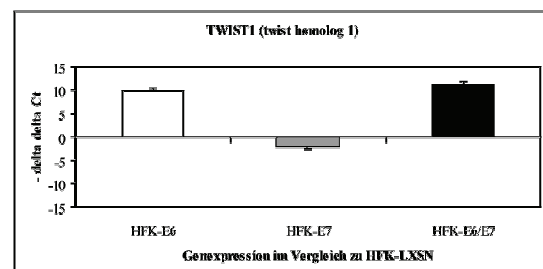
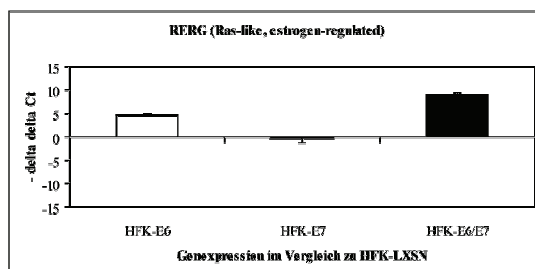
B



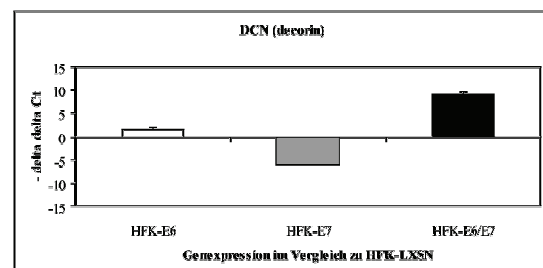
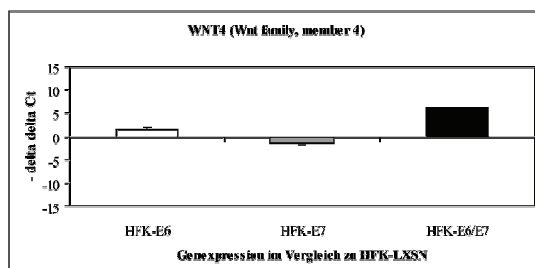
C



D



E



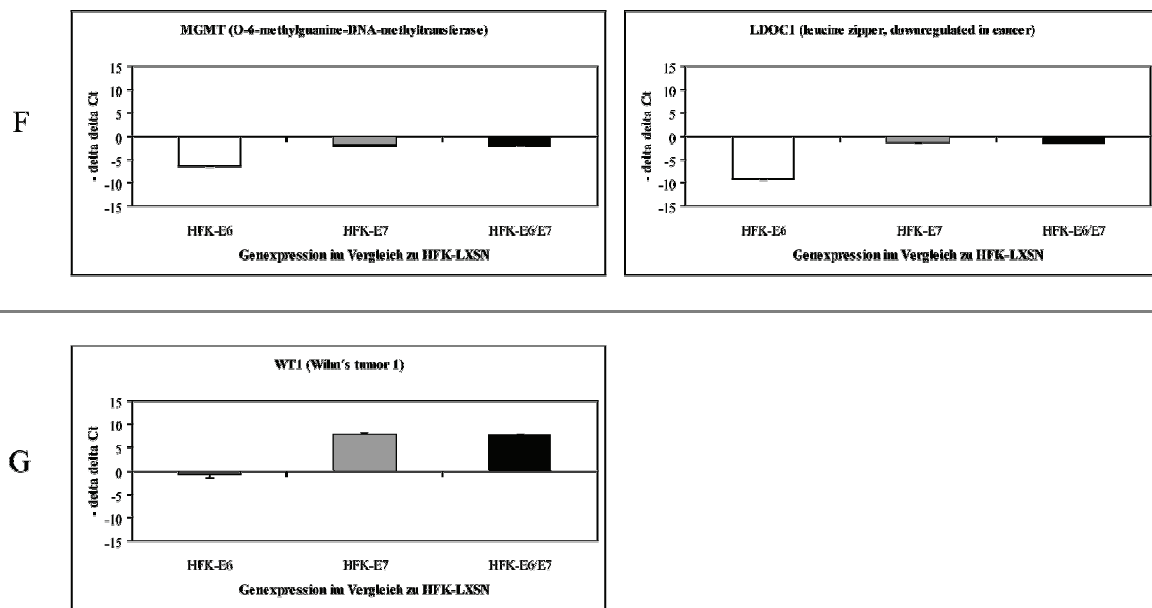


Abb. 9 Verifizierende Analyse der differentiellen Genexpression in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten mittels quantitativer Real Time RT-PCR.

Es wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus den Zelllinien HFK-LXSN, HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 für eine quantitative Real Time RT-PCR-Analyse unter Verwendung genspezifischer Taqman-Sonden für *DCN*, *DEFB1*, *IFNK*, *LDOC1*, *MGMT*, *REG*, *SPRR1B*, *THBS2*, *TNFSF10/TRAIL*, *TWIST1*, *WNT4* und *WT1* eingesetzt. Normalisierte Fluoreszenzsignale von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden zu denen von HFK-LXSN nach der deltadeltaCt-Methode in Relation gesetzt. Alle Real-Time RT-PCR-Ansätze wurden mindestens zweimal in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Thrombospondin 2 (*THBS2*) und *TRAIL* (*TNFSF10*) zeigten ebenfalls eine reduzierte mRNA Expression in HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 verglichen mit HFK-LXSN, wobei die stärkste Expressionsverminderung in den HPV16 E6/E7-positiven Keratinozyten zu verzeichnen war (**Abb. 9B**). Vermutlich führt die Expression beider viralen Onkogene zu einem synergistischen Effekt, durch den die mRNA-Expression von *THBS2* und *TNFSF10* in diesen Zellen besonders stark vermindert wird.

Zu den Genen, deren mRNA-Expression möglicherweise durch die Anwesenheit von HPV16 E6 beeinflusst wird, gehören *IFNK* (*interferon kappa*), *REG* (*ras-like, estrogen-regulated growth inhibitor*) sowie *TWIST1* (*twist homolog 1*). Ersteres wurde in HPV16 E6- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten im Vergleich zur Leervektorkontrolle weniger stark exprimiert, wohingegen *REG* und *TWIST1* in HFK-E6 und HFK-E6/E7 gegenüber HFK-LXSN eine erhöhte mRNA-Expression aufwiesen (s. **Abb. 9C und D**).

Zwei der untersuchten Gene (*MGMT*; *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* und *LDOC1*; *leucine zipper, downregulated in cancer*) zeigten eine stark reduzierte mRNA-Expression in HPV16 E6-positiven Keratinozyten, wohingegen für die HPV16 E7- und HPV16 E6/E7-positiven HFK verglichen mit der Leervektorkontrolle nur eine geringfügige

Verringerung der mRNA-Expression feststellbar war (s. **Abb. 9F**). Dies könnte für eine antagonistische Wirkung der HPV16 E7-Funktion gegenüber der HPV16 E6-Funktion sprechen.

Ein wahrscheinlich synergistischer Effekt der HPV16 E6- und E7-Funktion bei der Beeinflussung der zellulären Genexpression zeigte sich für *WNT4* (*Wnt family, member 4*) und *DCN* (*decorin*): Im Vergleich zu HFK-LXSN war die mRNA-Expression beider Gene in HFK-E6 geringfügig erhöht, in HFK-E7 etwas vermindert und in HFK-E6/E7 stark erhöht (s. **Abb. 9E**).

Wie der **Abb. 9G** zu entnehmen ist, konnte für *WT1* (*Wilm's tumor 1*) im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine verstärkte mRNA-Expression in HPV16 E7- und E6/E7-, nicht jedoch in HPV16 E6-positiven Keratinozyten detektiert werden, was auf eine möglicherweise dominante Rolle von HPV16 E7 bei der Beeinflussung der zellulären Expression des *WT1*-Gens hinweist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für alle untersuchten Gene tendenziell eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Mikroarray-Analyse und denen der Real Time RT-PCR festgestellt werden konnte. Geringfügige Abweichungen könnten u. a. in der höheren Sensitivität von Real Time RT-PCRs gegenüber Mikroarray-Analysen begründet liegen. Dass die Mikroarray-Analyse nur einmal durchgeführt wurde, während die Real Time RT-PCRs einmal wiederholt wurden, könnte ebenfalls zu leicht variierenden Resultaten beigetragen haben.

4.2.3. Analyse der Proteinexpression ausgewählter differenziell exprimierter Gene in E6-, E7- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten mittels Western blot

Nachdem eine differenzielle Genexpression in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven Keratinozyten gegenüber der Leervektorkontrolle auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2), sollten einige der unter Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Gene auch bezüglich ihrer Proteinexpression untersucht werden. Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte aus HFK-E6, HFK-E7, HFK-E6/E7 sowie HFK-LXSN isoliert und für eine Western blot-Analyse eingesetzt. Leider zeigten die zur Verfügung stehenden Antikörper für Twist1, WT1 und Decorin eine zu geringe Bindungsaffinität bzw. Spezifität gegenüber dem jeweiligen zellulären Protein, so dass keine definitive Aussage zu deren endogener Proteinexpression gemacht werden kann. Lediglich Wnt4 konnte in allen Zelllinien zweifelsfrei nachgewiesen werden. Tatsächlich konnte in den HPV16 E6/E7-positiven Zellen

etwa das 1,5- bis 2fache an Wnt4-Protein wie in der Leervektorkontrolle bzw. den Keratinozyten, die nur eines der viralen Onkogene exprimieren, detektiert werden (s. **Abb. 10**). Demnach war allerdings der Unterschied bzgl. der Expressionsintensität auf Proteinebene weniger stark ausgeprägt als auf mRNA-Ebene: Hier war für HFK-E6/E7 eine gegenüber HFK-LXSN, HFK-E6 und HFK-E7 ca. 5fach erhöhte Expression bestimmt worden (vgl. **Abb. 9E**).

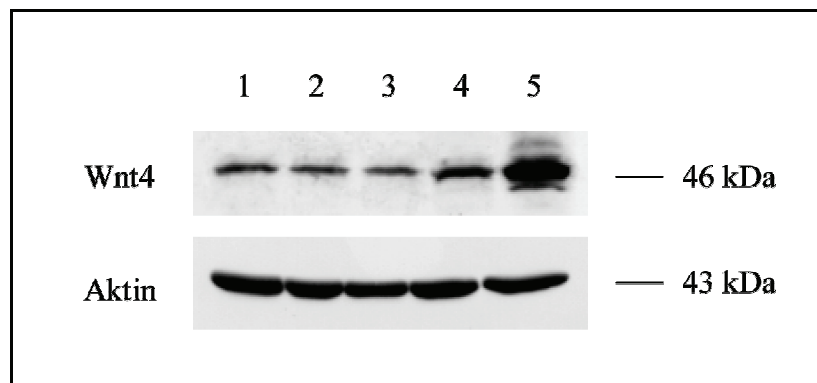


Abb. 10 Differenzielle Proteinexpression von Wnt4 in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Keratinozyten.

Je 50 µg Gesamtproteinextrakt aus den Zelllinien HFK-LXSN, HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden in einer Western blot-Analyse eingesetzt. Die Wnt4-Proteinexpression wurde mit einem Wnt4-spezifischen Antikörper detektiert. Die Untersuchung der Aktin-Proteinexpression diente als Kontrolle zur Überprüfung gleicher Proteinmengen pro Spur.

4.2.4. Eignung von in HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten differenziell exprimierten Genen als diagnostische Marker für CIN-Läsionen

Um zu überprüfen, ob einige der in HPV16 E6/E7-positiven Vohautkeratinozyten differenziell exprimierten Gene als Marker für differenzialdiagnostische Untersuchungen von Patienten mit zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) eingesetzt werden könnten, werden derzeit in Kollaboration mit Prof. C. Meijers vom Institut für Pathologie an der Freien Universität Amsterdam immunhistochemische Analysen für die Expression von Wnt4, RERG, Decorin, WT1 und Thrombospondin-2 an CIN-Läsionen im Vergleich zu Normalgewebe durchgeführt werden. Leider lagen noch keine Ergebnisse bei Abgabe dieser Arbeit vor, so dass an dieser Stelle noch keine Angaben über eine mögliche Eignung der untersuchten Gene als diagnostische Marker gemacht werden können.

4.3. Etablierung tumorigener humaner Epithelzellen unter *in vitro* Bedingungen durch Expression definierter genetischer Elemente

4.3.1. Experimentelle Strategie

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, sind humane Vorhautkeratinozyten, die nach retroviraler Infektion mit einem entsprechenden Vektor die HPV16-Onkogene E6 und E7 (HFK-E6/E7) stabil exprimieren, immortal und weisen nach Langzeitkultivierung diverse chromosomale Veränderungen sowie ein verändertes Genexpressionsprofil gegenüber primären, den retroviralen Leervektor enthaltenden Vorhautkeratinozyten auf. Dennoch bilden sie nach subkutaner Injektion keine Tumore in immundefizienten Mäusen.

Im Weiteren sollte festgestellt werden, ob in diesen HPV16 E6/E7-exprimierenden immortalisierten Vorhautkeratinozyten durch Expression definierter Onkogene eine maligne Transformation induziert werden kann. Hierzu sollten in den Zellen zunächst H-Ras und ggf. c-Myc überexprimiert werden. Sollte dieser Schritt nicht ausreichen, um einen tumorigenen Phänotyp zu induzieren, sollte die Funktion der Proteinphosphatase 2A durch ektope Expression von SV40 st oder CIP2A inhibiert werden. Auf die Aktivierung der Telomerase durch ektope Expression von hTERT wurde verzichtet, da bereits eine stabile endogene, vermutlich durch HPV16 E6 hervorgerufene hTERT-Expression und eine gegenüber der Leervektorkontrolle deutlich erhöhte Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 4.1.2).

Die o. g. Gene bzw. cDNAs sollten mit Hilfe retroviraler Vektoren in die entsprechenden Zellen eingebracht werden, um eine stabile Expression zu erreichen. Positive Klone sollten durch Antibiotikagabe selektiert werden. Diese sollten als polyklonale Kultur erhalten und für nachfolgende Experimente eingesetzt werden, um klonale Effekte möglichst auszuschließen.

Abb. 11 veranschaulicht schematisch die experimentelle Strategie zur Etablierung des beschriebenen *in vitro* Tumorprogressionsmodells.

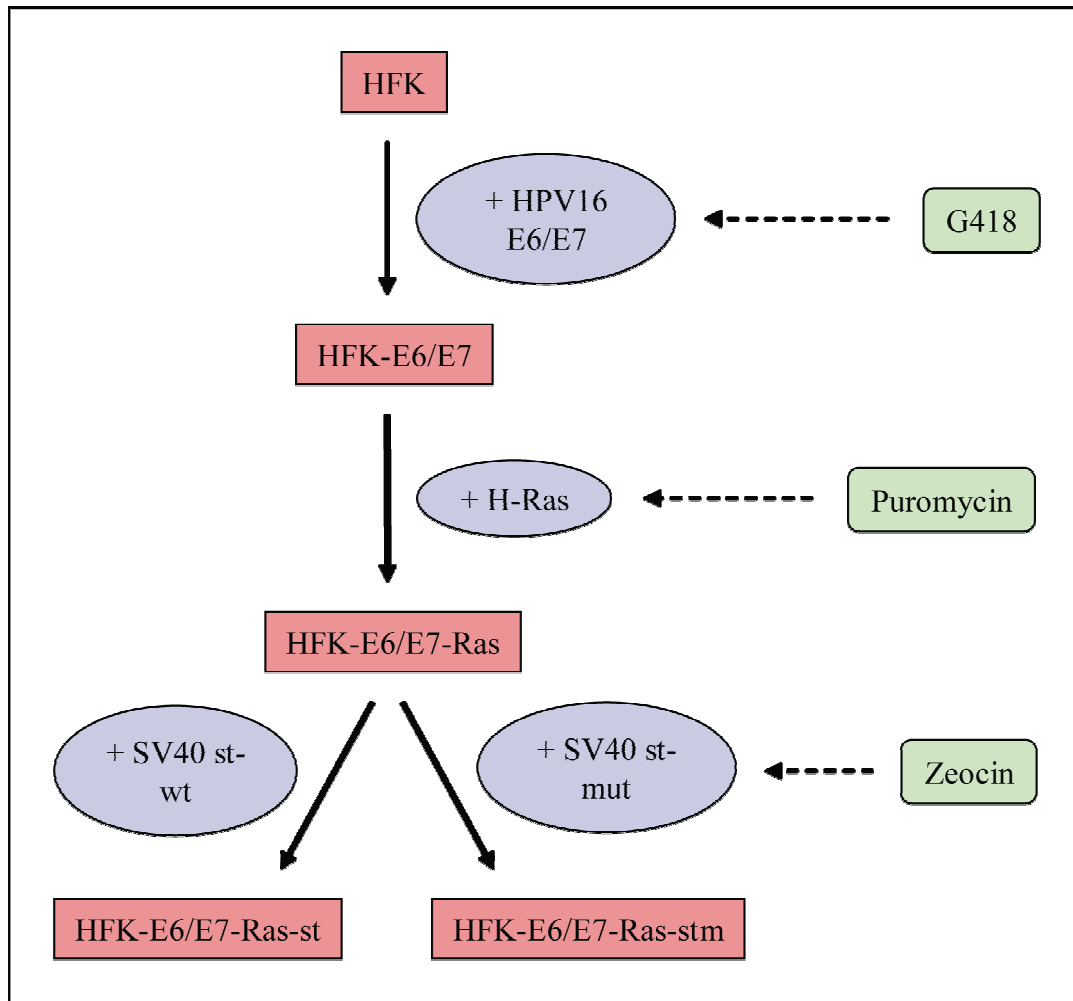


Abb. 11 Schematische Darstellung der Transfektionsstrategie zur Generierung HPV16 E6/E7, H-Ras, und SV40st-positiver humaner Vorhautkeratinozyten (HFK).

Ausgehend von humanen Vorhautkeratinozyten, die bereits HPV16 E6/E7 exprimierten (dünner Pfeil) und längere Zeit *in vitro* kultiviert worden waren (HFK-E6/E7) sollte eine sequenzielle retrovirale Transfektion (dicke Pfeile) mit pBABE-Derivaten (Elipsen) und anschließender Antibiotika-Selektion (gestrichelte Pfeile) zu einer stabilen Expression von H-Ras (HFK-E6/E7-Ras), SV40 st-Wildtyp (HFK-E6/E7-Ras-st) bzw. einer verkürzten SV40 st-Variante (HFK-E6/E7-Ras-stm) führen.

4.3.2. Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie HFK-E6/E7-Ras

Um H-Ras in der HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten-Zelllinie HFK-E6/E7 stabil zu exprimieren, wurden die Zellen mit dem retroviralen Vektor pBABEpuro-H-rasV12 transfiziert. Die für H-ras kodierende Sequenz trägt eine Punktmutation, wodurch eine konstitutiv hohe Expression des H-Ras-Proteins gewährleistet wird. Parallel wurde der Leervektor transfiziert. Puromycin-resistente Klone wurden selektiert und entsprechend mit HFK-E6/E7-Ras bzw. HFK-E6/E7-Puro benannt.

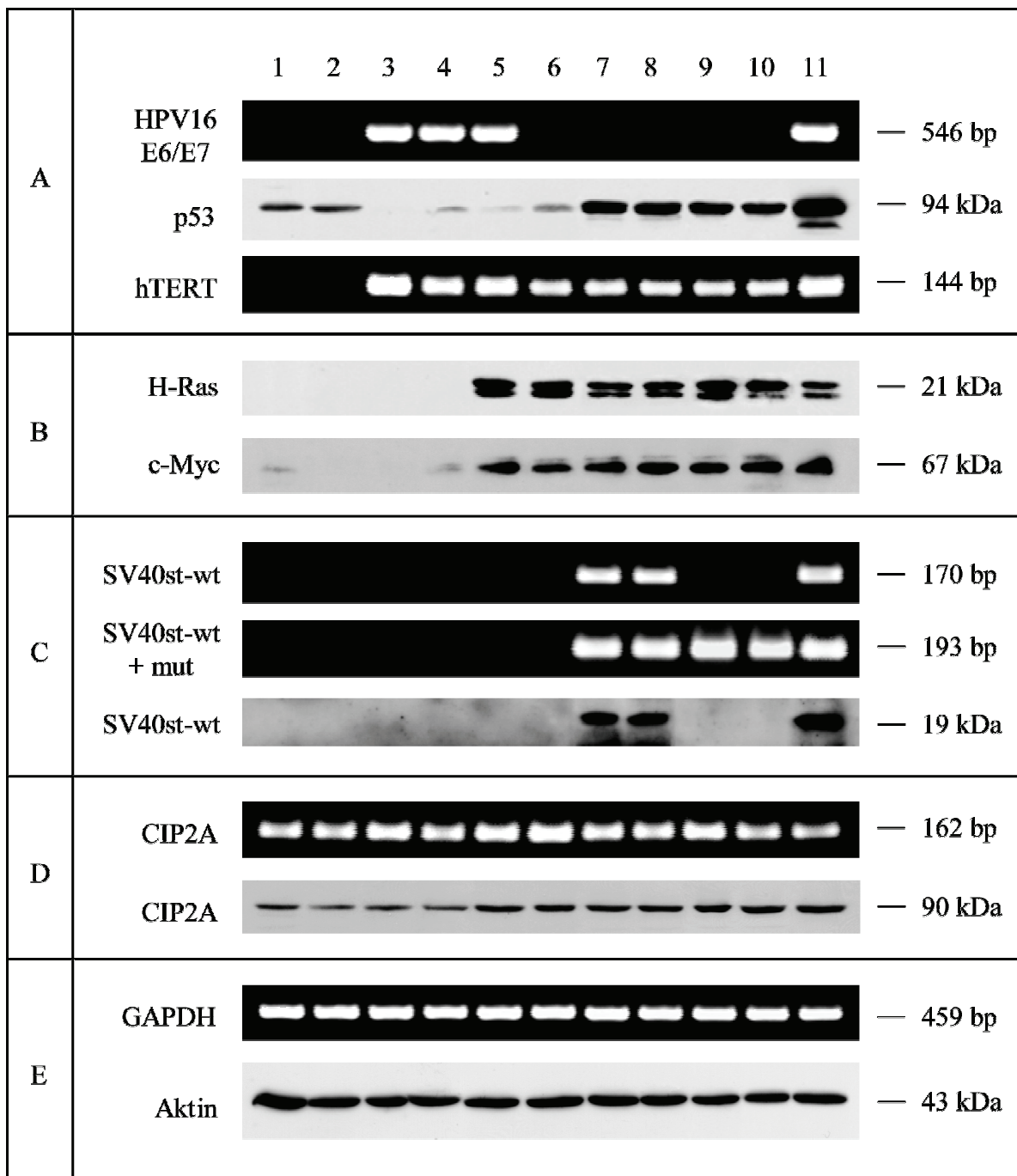


Abb. 12 Expression verschiedener zellulärer und viraler Onkogene in langzeitkultivierten HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten (HFK-E6/E7) nach Transfektion mit H-Ras-, und SV40 st-tragenden retroviralen Vektoren.

Die mRNA- und/oder Proteinexpression der dargestellten Gene wurde mittels RT-PCR bzw. Western blot-Analyse unter Verwendung Transkript-spezifischer Primer bzw. Protein-spezifischer Antikörper bestimmt. Für die RT-PCRs wurde 1 µg Gesamt-RNA-Extrakt, zur Untersuchung der Proteinexpression 50 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Von den GAPDH-spezifischen RT-PCRs und den Aktin-spezifischen Western blot-Analysen, die zum Nachweis gleicher RNA- bzw. Proteinmengen dienten, ist jeweils eine repräsentative Versuchsreihe gezeigt. Molekulargewichte und Fragmentgrößen sind angegeben. 1) HFK, 2) HFK-LXSN, 3) HFK-E6/E7, 4) HFK-E6/E7-Puro, 5) HFK-E6/E7-Ras, 6) HFK-E6/E7-Ras-Zeo, 7) HFK-E6/E7-Ras-st#7.2, 8) HFK-E6/E7-Ras-st#7.5, 9) HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4, 10) HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4, 11) Pos.-Kontr. (HPV16 E6/E7/hTERT: SiHa, p53: HaCaT, H-Ras: NHBE-hT-LT-Ras, c-Myc/CIP2A: HeLa, SV40 st wt/mut: HEK-E6/E7-TRST).

Nach erfolgreicher Transfektion wurde in allen Zelllinien sowohl die Expression der eingebrachten Faktoren als auch der durch sie möglicherweise induzierten zellulären Gene untersucht. Wie **Abb. 12** zeigt, konnte für die Zelllinie HFK-E6/E7-Ras eine Expression der HPV16-Onkogene E6 und E7 auf mRNA-Ebene verifiziert werden. Zudem konnte eine starke H-Ras-Proteinexpression sowie eine deutliche Induktion der c-Myc-Proteinexpression detektiert werden. Daher wurde nachfolgend darauf verzichtet, einen *c-myc*-tragenden retroviralen Vektor in die H-Ras-positiven Zellen einzubringen, um dieses zelluläre Onkogen überzuexprimieren. Des Weiteren war für die HFK-E6/E7-Ras-Zellen ähnlich wie für die Vorgängerzelllinie eine Reduktion der p53-Proteinexpression gegenüber den nicht-immortalen primären Vorhautkeratinozyten feststellbar, wodurch die funktionelle Aktivität des HPV16 E6-Proteins nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus ergaben RT-PCRs und Telomerase-Aktivitätsmessungen mittels TRAP-ELISA für die HFK-E6/E7-Ras-Zellen erwartungsgemäß eine im Vergleich zu den Primärzellen erhöhte hTERT-mRNA-Expression sowie eine gesteigerte Telomerase-Aktivität vergleichbar der der HFK-E6/E7-Zellen (s. **Abb. 13**).

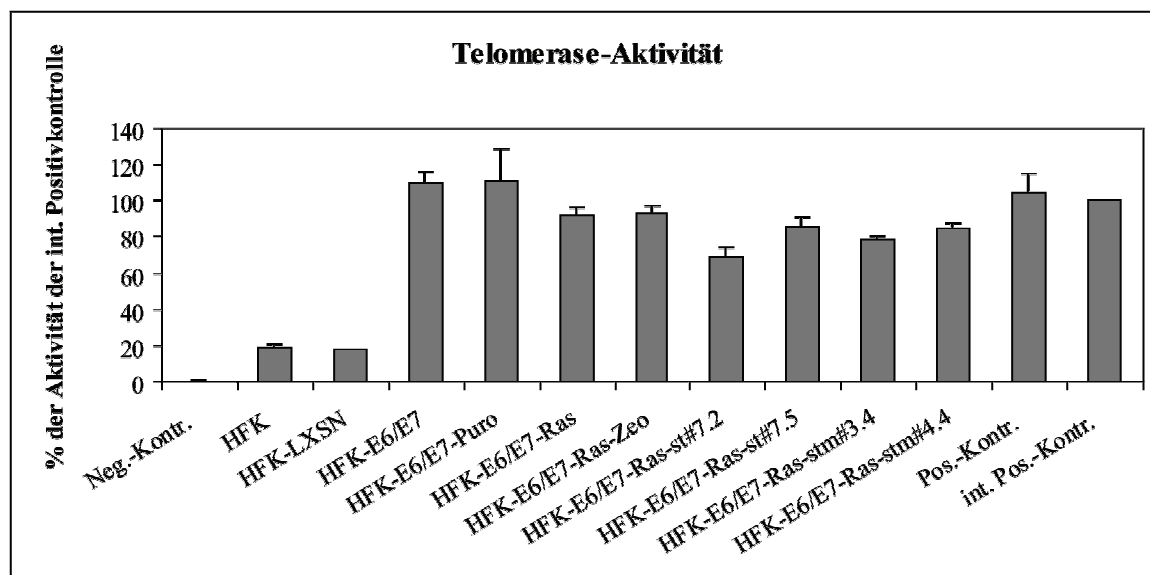


Abb. 13 Bestimmung der Telomerase-Aktivität in HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten nach Transfektion mit H-Ras-, und SV40 st-tragenden retroviralen Vektoren.

Die Telomerase-Aktivität wurde mit einem TRAP-basierenden ELISA-Testsystem (Roche) bestimmt. Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen sowie $2 \mu\text{l}$ der vom Hersteller mitgelieferten internen Positivkontrolle (int. Pos.-Kontr.) bzw. Negativkontrolle (Neg.-Kontr.) eingesetzt. Dargestellt ist die enzymatische Aktivität (=Absorption bei 450 nm) der einzelnen Proben in Relation zur internen Positivkontrolle in Prozent. SiHa-Zellen dienen als Positivkontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei Experimenten mit Doppelbestimmungsansätzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Wie der **Abb. 14** entnommen werden kann, ließen sich die HPV16 E6/E7 + H-Ras-positiven Zellen über einen Beobachtungszeitraum von ca. 80 Tagen ohne wesentliche Wachstumsbeeinträchtigungen *in vitro* kultivieren. Auffallend ist jedoch eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien HFK-E6/E7-Ras und HFK-E6/E7-Puro gegenüber der Parentalzelllinie. Vermutlich ist dies durch den Stress bedingt, den sowohl die Infektion mit retroviralen Partikeln als auch die Puromycin-Behandlung in den Zellen auslöste.

Um die tumorigenen Eigenschaften der HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven humanen Vorhautkeratinozyten zu untersuchen, wurden zwei Versuche durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen in einem Kolonieformationsassay auf ihre Fähigkeit hin getestet, unabhängig von einer festen Verankerungsmatrix wachsen zu können. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen in einer zweischichtigen semisoliden Agarmatrix ausgesät und nach drei Wochen auf Koloniebildung hin überprüft. Wie **Abb. 15** veranschaulicht, konnte für humane Vorhautkeratinozyten, die HPV16 E6/E7 exprimieren, lediglich eine sporadische Kolonieformation beobachtet werden. Die zusätzliche Expression von H-Ras induzierte eine geringfügig gesteigerte kolonienbildende Eigenschaft.

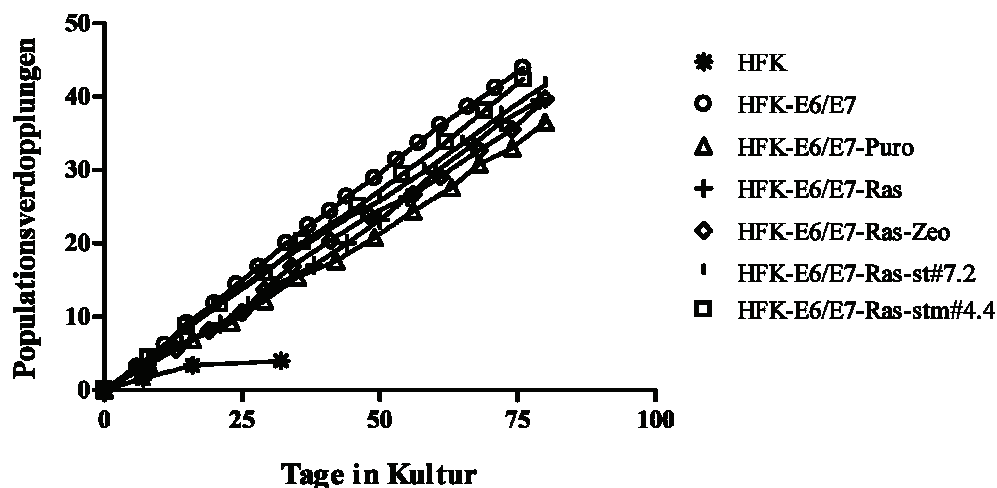
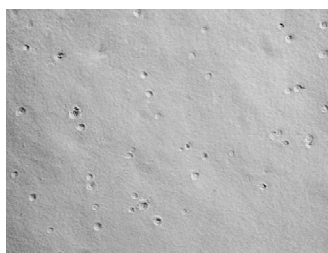
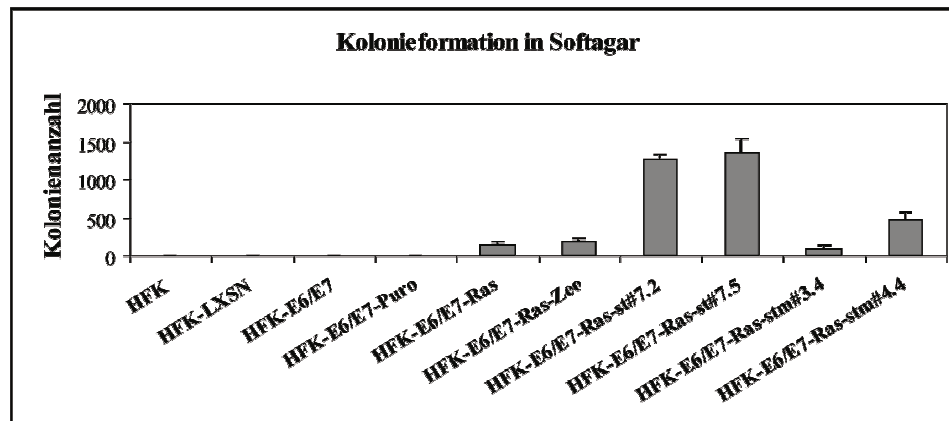


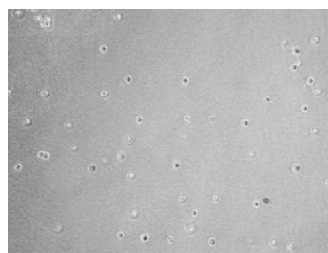
Abb. 14 *In vitro* Wachstumsverhalten von langzeitkultivierten HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten (HFK-E6/E7) nach Transfektion mit H-Ras-, und SV40 st- tragenden retroviralen Vektoren

Dargestellt sind die nach der Formel $\log_2[\text{Gesamtzellzahl/ausgesäte Zellzahl}]$ bestimmten Populationsverdopplungen von HFK (repräsentativ für HFK und HFK-LXSN), HFK-E6/E7, HFK-E6/E7-Puro, HFK-E6/E7-Ras, HFK-E6/E7-Ras-Zeo, HFK-E6/E7-Ras-st#7.2 (repräsentativ für HFK-E6/E7-Ras-st#7.2 und 7.5) und HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4 (repräsentativ für HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4 und 4.4) über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen.

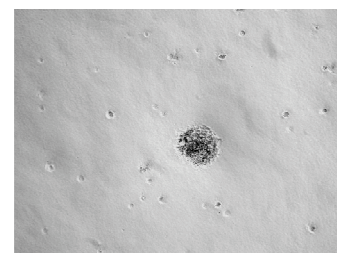
A



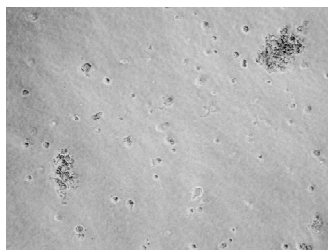
HFK



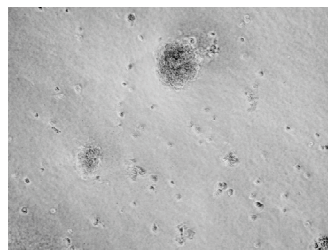
HFK-LXSN



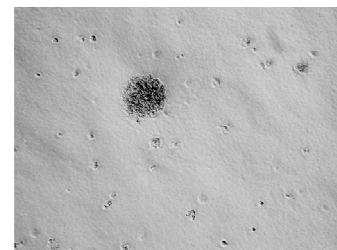
HFK-E6/E7



HFK-E6/E7-Puro

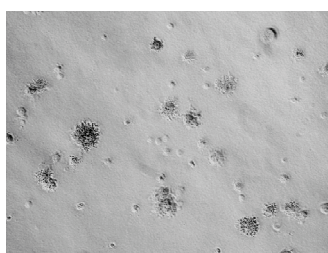


HFK-E6/E7-Ras

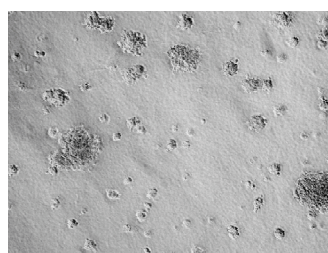


HFK-E6/E7-Ras-Zeo

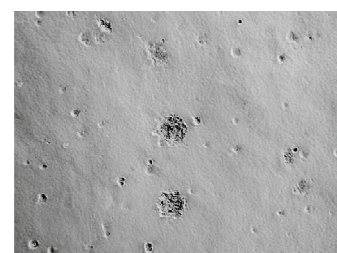
B



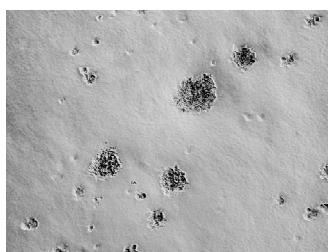
HFK-E6/E7-Ras-st#7.2



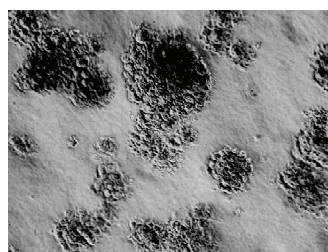
HFK-E6/E7-Ras-st#7.5



HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4



HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4



SiHa

Abb. 15 Test von langzeitkultivierten HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten (HFK-E6/E7) bzgl. ihrer Fähigkeit zur Koloniebildung in Softagar nach Transfektion mit H-Ras-, und SV40 stragenden retroviralen Vektoren.

Es wurden 2×10^5 Zellen in einer zweischichtigen, semisoliden Agar-Matrix ausgesät und nach drei Wochen ausgewertet. HFK und HFK-LXSN wurden als Negativkontrollen, SiHa-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt. (A) Repräsentative Ausschnitte, die bei 25facher lichtmikroskopischer Vergrößerung fotografiert wurden. (B) Quantitative Auswertung von jeweils 4 Experimenten. Gezählt wurden alle Kolonien $\geq 0,2$ mm Durchmesser bei geeigneter lichtmikroskopischer Vergrößerung. Bei mehr als 50 Kolonien pro Schale wurden 8 repräsentative Ausschnitte à 25 mm^2 ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. Die Balken geben die Mittelwerte inklusive Standardabweichungen (Fehlerbalken) an. Auf die Auszählung der Positivkontrolle wurde aufgrund der Unübersichtlichkeit der Kolonien verzichtet.

Zum zweiten wurden jeweils 5×10^6 HFK-E6/E7-Ras-Zellen unter Zusatz von Matrigel, das die Verankerung und das Wachstum der humanen Zellen im Mausgewebe unterstützt, subkutan in immundefiziente Nacktmäuse injiziert. Dies führte während eines Beobachtungszeitraums von drei Monaten bei keinem der Tiere zu einer eindeutigen Tumorbildung. Allerdings entwickelte eines der drei Versuchstiere auf einer Seite ein Knötchen von 4,5 mm im Durchmesser (ohne Abb.).

Somit konnte für die Vorhautkeratinozytenzelllinie HFK-E6/E7-Ras, die HPV16 E6/E7 und H-Ras exprimiert und infolgedessen durch eine erhöhte c-Myc- und hTERT-Expression sowie eine verstärkte Telomerase-Aktivität gekennzeichnet ist, gezeigt werden, dass sie keinen vollständig ausgeprägten tumorigenen Phänotyp besitzt, d. h. nur geringfügig Kolonien in Softagar bildet und nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse innerhalb von drei Monaten keine eindeutige Tumorentwicklung induziert.

4.3.3. Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie HFK-E6/E7-Ras-st

Da die unter Abschnitt 4.3.2 beschriebenen, HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten offenbar keinen vollständig ausgeprägten Phänotyp besaßen, stellte sich die Frage, ob eine zusätzliche Expression von SV40 st und somit eine Inhibierung der PP2A-Funktion zu einer malignen Transformation dieser Zellen führen würde. Daher wurden die HFK-E6/E7-Ras-Zellen mit dem retroviralen Vektor pBABEzeo-st transfiziert. Zur Kontrolle wurde außerdem eine retrovirale Transfektion mit dem Leervektor sowie pBABEzeo-st1-110 durchgeführt, wobei letzterer die genetische Information für eine C-terminal verkürzte SV40 st-Variante trägt, die nicht mehr in der Lage ist, PP2A zu binden. Durch Zeocin-Behandlung selektierte Populationen wurden entsprechend mit HFK-E6/E7-Ras-Zeo, HFK-E6/E7-Ras-st bzw. HFK-E6/E7-Ras-stm (m = Mutante) bezeichnet.

Die Effizienz der Transfektion mit pBABEzeo-st war nur gering. Das Transfektionsprotokoll wurde häufig variiert, die Ansätze wurden mehrfach wiederholt. Trotzdem entstanden nur aus ca. 30 % der Transfektionsversuche Klone, von denen etwa 43 % positiv auf st-mRNA-Expression getestet werden konnten. Die Transfektion mit pBABEzeo-st1-110 war deutlich effizienter. Hier gingen aus ca. 70 % der Ansätze Antibiotika-resistente Zellen hervor, die überwiegend positiv auf eine SV40 stm-mRNA-Expression getestet werden konnten. Im Folgenden sind repräsentativ für alle SV40 st (Wildtyp)-exprimierenden Zellen die Zelllinien HFK-E6/E7-Ras-st#7.2 und 7.5 sowie stellvertretend für alle SV40 stm (Mutante)-exprimierenden Zellen die Zelllinien HFK-E6/E7-Ras-stm#3.4 und 4.4 dargestellt. Wie **Abb. 12** veranschaulicht, konnte neben der Expression der entsprechenden SV40 st-Varianten (die Primer für den Nachweis der Transkripte der SV40 st-Mutante erkennen auch die Wildtyp-mRNA) wie erwartet eine gegenüber HFK-E6/E7 deutlich erhöhte Proteinexpression für H-Ras und c-Myc festgestellt werden. Allerdings konnte in keiner der SV40-st-Wildtyp- bzw. -Mutante-positiven Zelllinien eine HPV16 E6/E7-mRNA-Expression mehr nachgewiesen werden. Auch die p53-Proteinexpression war im Vergleich zu primären Vorhautkeratinozyten nicht mehr reduziert, was ebenfalls auf einen Verlust der HPV16 E6-Expression hindeutet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in den generierten Zelllinien HFK-E6/E7-Ras-st und HFK-E6/E7-Ras-stm die Expression der HPV-Onkogene E6 und E7 nicht stabil war. Dennoch konnten die Zellen über einen Zeitraum von etwa 80 Tagen unter *in vitro* Bedingungen kultiviert werden, ohne dass sich ein Wachstumsdefizit beobachten ließ (s. **Abb. 14**). Interessanterweise ergab der TRAP-ELISA keine verminderte Telomerase-Aktivität, obwohl die Expression von hTERT gegenüber der Parentalzelllinie reduziert war (s. **Abb. 12** und **13**). Möglicherweise ersetzen andere zelluläre Faktoren, z.B. c-Myc, die Telomerase-aktivierende Funktion von HPV16 E6. Auch bildeten sowohl die HFK-E6/E7-Ras-st#7.2- und HFK-E6/E7-Ras-st#7.5- als auch die HFK-E6/E7-Ras-stm#4.4-Zellen vermehrt Kolonien in Softagar. Eine Inokulation von jeweils 5×10^6 Zellen zusammen mit Matrigel führte darüber hinaus bei den SV40 st-Wildtyp-exprimierenden Keratinozyten z.T. zu einer Tumorinduktion: Die HFK-E6/E7-Ras-st#7.2-Zellen wuchsen in einem von sechs Fällen, die HFK-E6/E7-Ras-st#7.5-Zellen in zwei von sechs Fällen zu Tumoren aus. Wie der **Abb. 16** zu entnehmen ist, entwickelten die entsprechenden Versuchstiere nach einer Latenzzeit von 40-45 Tagen unterschiedlich schnell wachsende Tumore. Einer der Tumore wurde für eine histopathologische Begutachtung präpariert, das Ergebnis der HE-Färbung lag bei Abgabe dieser Arbeit jedoch noch nicht vor. Der Effekt einer weitreichenden Immunsuppression durch eine Bestrahlung der Versuchstiere vor der Injektion wird derzeit ebenfalls noch

untersucht. Zudem sollen einige *in vivo* zu Tumoren ausgewachsene humane Zellen reisoliert und auf ihr Genexpressionsmuster bzgl. der eingebrachten Onkogene getestet werden. Auf diese Weise soll analysiert werden, ob die HPV16-Onkogene E6 und E7 *in vivo* wieder exprimiert wurden. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob unter *in vivo* Bedingungen weitere Genexpressionsveränderungen induziert wurden, die zur malignen Transformation beigetragen haben.

In vivo Wachstum

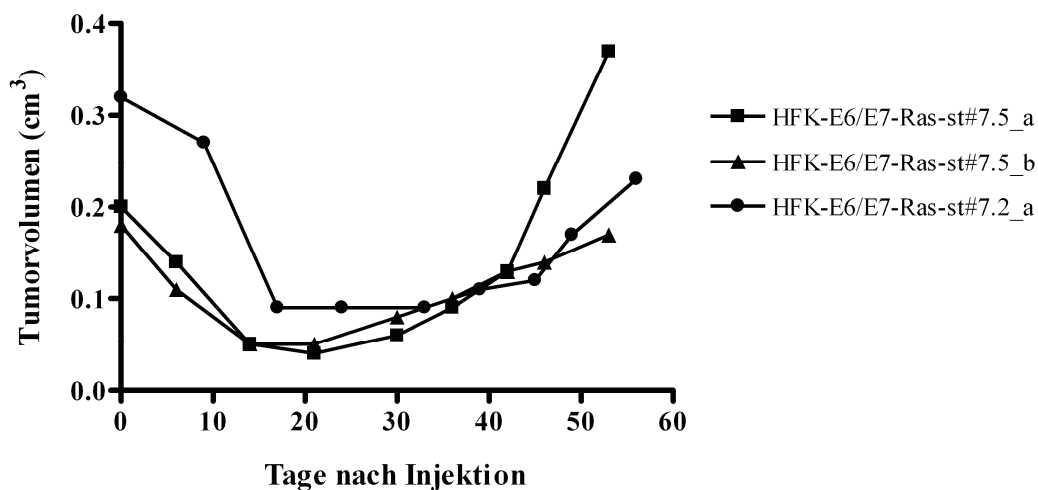


Abb. 16 Wachstumsverlauf der durch subkutane Injektion von HFK-E6/E7-Ras-st#7.2- und HFK-E6/E7-Ras-st#7.5-Zellen in immundefizienten Nacktmäusen induzierten Tumore.

Es wurden jeweils 5×10^6 Zellen zusammen mit Matrigel subkutan in 6-8 Wochen alte immundefiziente Nacktmäuse inokuliert. Das Tumolvolumen wurde durch regelmäßiges Ausmessen in zwei Dimensionen unter Verwendung der Formel $\frac{4}{3}\pi r^3$ (r = Radius) bestimmt.

4.3.4. Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien K-E6/E7-Ras und K-E6/E7-Ras-st

Da in HFK-E6/E7-Zellen offensichtlich keine stabile Expression von SV40 st-Wildtyp oder SV40 st-Mutante bei gleichzeitiger stabiler Expression von HPV16 E6/E7 erreicht werden konnte (s. vorangegangenes Kapitel), stellte sich die Frage, ob dieser Effekt eine Besonderheit für diesen Zellklon darstellt – zumal auch die Zeocin-Leervektorkontrolle einen Verlust der HPV16 E6/E7-Expression zeigte – und ob eine Transfektion mit pBABEzeo-Derivaten zeitnah zu den Transfektionen mit pLXSN-E6/E7 und pBABEpuro-H-rasV12 eine negative Beeinflussung der Expression der verschiedenen viralen Onkogene verhindern würde. Daher

wurde eine zweite, unabhängige Population polyklonaler humaner Vorhautkeratinozyten, die im Folgenden mit K abgekürzt wird, mit pLXSN-E6/E7 bzw. dem Leervektor pLXSN retroviral transfiziert. Die daraus resultierenden G418-resistenten Klone wurden als K-E6/E7 bzw. K-LXSN bezeichnet. Anschließend wurden die K-E6/E7-Zellen wie zuvor die HFK-E6/E7-Zellen mittels retroviraler Transfektion mit pBABEpuro-H-*ras*V12 bzw. pBABEpuro und dann mit pBABEzeo, pBABEzeo-st sowie pBABEzeo-st1-110 transfiziert. Puromycin-resistente Klone wurden analog den HFK-E6/E7-Zellen mit K-E6/E7-Ras bzw. K-E6/E7-Puro, Zeocin-resistente Klone mit K-E6/E7-Ras-Zeo, K-E6/E7-Ras-st bzw. K-E6/E7-Ras-stm benannt. In **Abb. 17** sind die einzelnen Transfektionsschritte noch einmal schematisch zusammengefasst.

Die Transfektion der primären Vorhautkeratinozyten mit pLXSN-E6/E7 verlief ohne technische Schwierigkeiten. Die aus der Transfektion hervorgegangene polyklonale Population K-E6/E7 zeigte eine starke HPV16 E6/E7-mRNA-Expression sowie eine gegenüber K- und K-LXSN-Zellen deutlich reduzierte p53-Proteinexpression (s. **Abb. 18**). Eine im Vergleich zu den Primärkeratinozyten verstärkte hTERT-mRNA-Expression und Telomerase-Aktivität war ebenfalls feststellbar, allerdings waren diese deutlich schwächer als bei den HFK-E6/E7-Zellen (s. **Abb. 18** und **19**). Es konnte jedoch eine Erhöhung der hTERT-mRNA-Expression und der Telomerase-Aktivität nach längerer Kultivierung in Zellkultur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte für einen Zeitraum von etwa 80 Tagen ein gleichbleibendes, wenn auch im Vergleich mit den HFK-E6/E7-Zellen langsames Wachstum unter *in vitro* Bedingungen beobachtet werden (s. **Abb. 20**). Kolonieformationsassays und subkutane Injektionen mit Matrigel in immundefiziente Nacktmäuse ergaben wie schon für HFK-E6/E7 keinen Hinweis auf tumorigene Eigenschaften (s. **Abb. 21** und Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Expression und Funktionalität der eingebrachten HPV16-Onkogene in den immortalisierten K-E6/E7-Zellen bestätigt werden konnte, wurden die Zellen mit pBABEpuro und pBABEpuro-H-*ras*V12 retroviral transfiziert. Die Transfektionseffizienz war etwas geringer als bei den HFK-E6/E7-Zellen, vermutlich aufgrund der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit. Zudem benötigten die K-E6/E7-Zellen nach der Transfektion eine längere Erholungsphase als die HFK-E6/E7-Zellen, die mit den gleichen Vektoren transfiziert worden waren (ohne Abbildung).

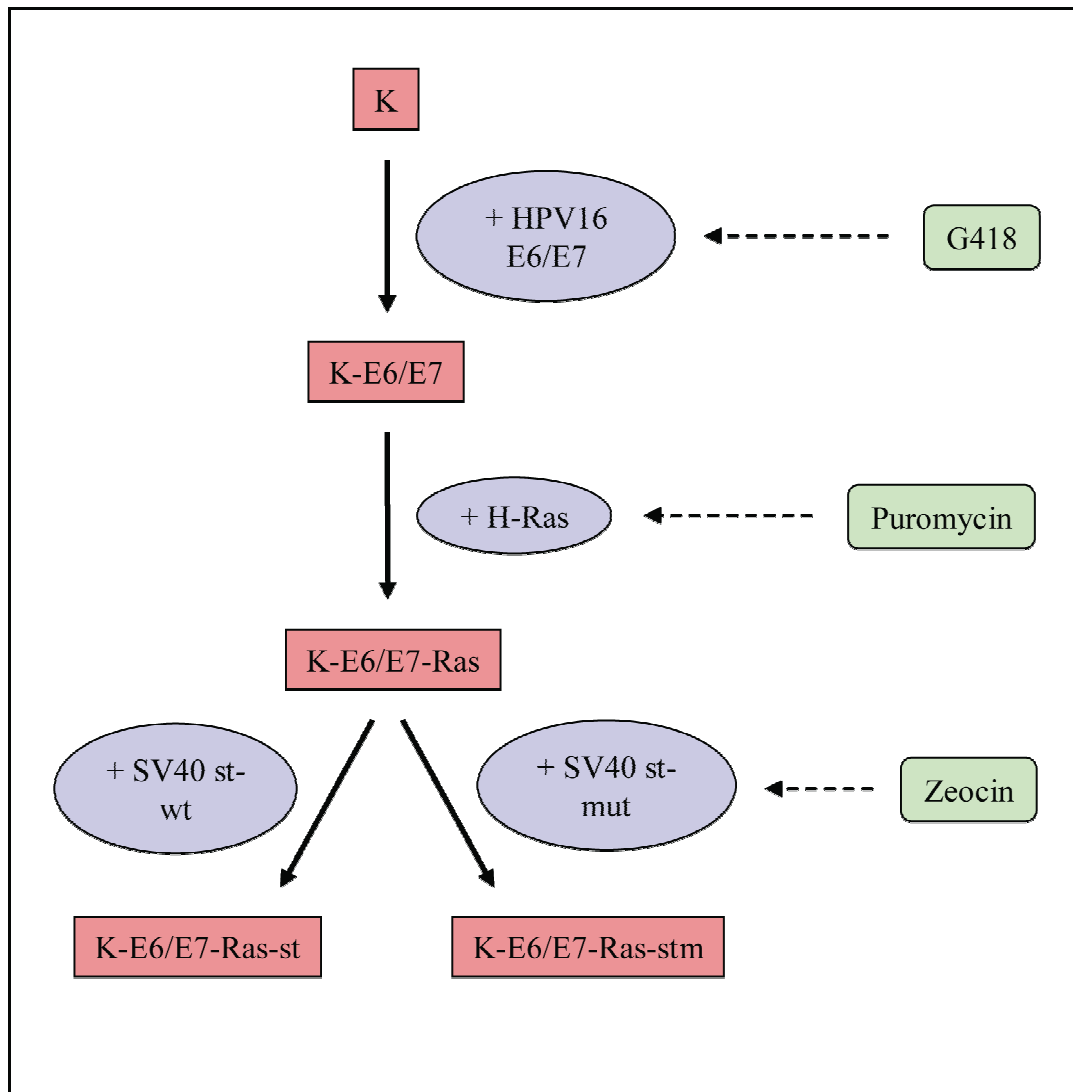


Abb. 17 Schematische Darstellung der Transfektionsstrategie zur Generierung HPV16 E6/E7, H-Ras, und SV40 st-positiver humaner Vorhautkeratinozyten (K).

Primäre humane Vorhautkeratinozyten (K) sollten sequenziell retroviral transfiziert werden, um HPV16 E6/E7, H-Ras, SV40 st-Wildtyp bzw. SV40st-Mutante stabil zu exprimieren. Elipsen repräsentieren die retroviralen Vektoren mit den einzubringenden Genen/cDNAs. Die Selektion positiver Klone sollte mittels Antibiotikagabe erfolgen (gestrichelte Linie).

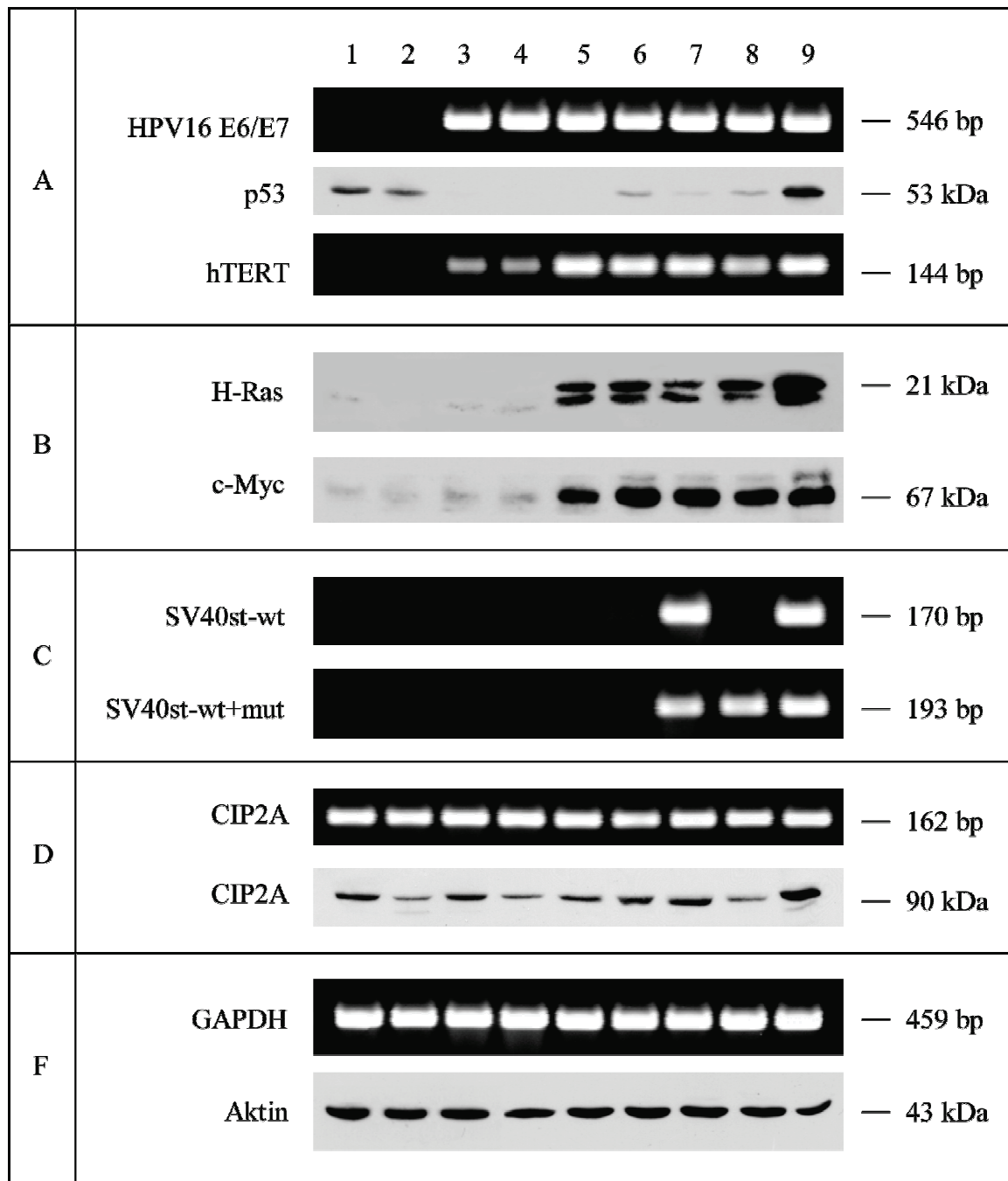


Abb. 18 Expression verschiedener zellulärer und viraler Onkogene in humanen Vorhautkeratinozyten nach Transfektion mit HPV16 E6/E7-, H-Ras-, und SV40 st- tragenden retroviralen Vektoren.

Die Expression der angegebenen Gene wurde mittels RT-PCR und/oder Western blot-Analyse untersucht. Für die RT-PCRs wurden 1 µg Gesamt-RNA-Extrakt und Transkript-spezifische Primer eingesetzt. Die Primer, die die mRNA für SV40st1-110 erkennen, binden auch an die SV40-Wildtyp-mRNA. Die Proteinexpression wurde mit Protein-spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrollen sind eine repräsentative RT-PCR-Reihe für GAPDH und eine repräsentative Western blot-Analyse für Aktin gezeigt. Folgende Positivkontrollen wurden verwendet: SiHa (HPV16 E6/E7, hTERT), HaCaT (p53), NHBE-hT-LT-Ras (H-Ras) HeLa (c-Myc, CIP2A), HEK-E6/E7-TRST (SV40st wt + mut). Molekulargewichte und Fragmentgrößen sind angegeben. 1) K, 2) K-LXSN, 3) K-E6/E7, 4) K-E6/E7-Puro, 5) K-E6/E7-Ras, 6) K-E6/E7-Ras-Zeo#2.2, 7) K-E6/E7-Ras-st#1.4, 8) K-E6/E7-Ras-stm#4.2, 9) Pos.-Kontr.

Für die resultierenden K-E6/E7-Ras-Zellen konnte eine starke H-Ras- und eine erhöhte c-Myc-Proteinexpression nachgewiesen werden (s. **Abb. 18**). Die Expression von HPV16 E6/E7 blieb stabil, die p53-Proteinexpression war vergleichbar der von K-E6/E7-Zellen (s. **Abb. 18**). Interessanterweise waren die K-E6/E7-Ras-Zellen im Unterschied zur Parentalzelllinie sowie zur Leervektorkontrolle durch eine starke hTERT-mRNA-Expression und Telomerase-Aktivität gekennzeichnet (s. **Abb. 18** und **19**). Ein direkter Zusammenhang zwischen H-Ras-Expression und Telomerase-Aktivierung ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Möglicherweise hat der hohe Selektionsdruck zu einem begünstigten Wachstum von Zellen mit hoher Telomerase-Aktivität geführt.

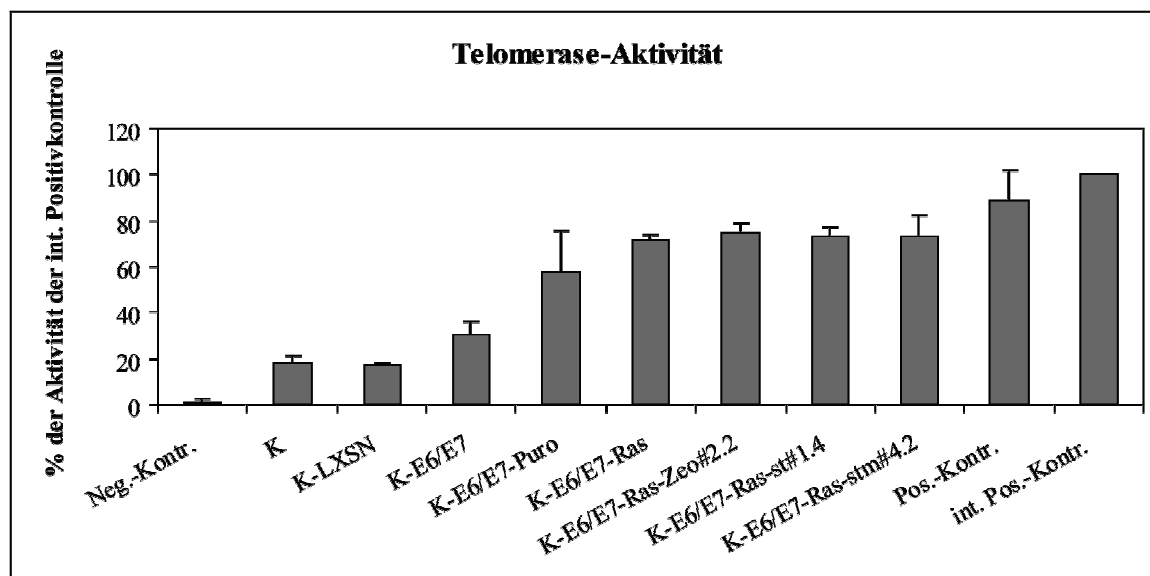


Abb. 19 Messung der Telomerase-Aktivität in HPV16 E6/E7-, H-Ras- und SV40 st-positiven humanen Vorhautkeratinozyten.

Zur Bestimmung der Aktivität der zellulären Telomerase in den angegebenen Zelllinien wurde ein TRAP-ELISA-Kitsystem (Roche) benutzt. Eingesetzt wurden jeweils 2×10^5 Zellen sowie 2 µl der vom Hersteller mitgelieferten Positivkontrolle (int. Pos.-Kontr.) bzw. Negativkontrolle (Neg.-Kontr.). Die der enzymatischen Aktivität der Telomerase entsprechenden Absorptionswerte (gemessen bei 450 nm) der angegebenen Zellen wurden zu denen der internen Positivkontrolle in Beziehung gesetzt und sind in Prozent angegeben. SiHa-Zellen dienten als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Doppelbestimmungsansätzen inklusive Standardabweichung (= Fehlerbalken).

Eine Untersuchung der Populationsverdopplungen unter *in vitro* Bedingungen ergab ein unvermindertes Wachstum für einen Zeitraum von ca. 80 Tagen (s. **Abb. 20**). Allerdings war wie schon bei den HFK-E6/E7-Ras- und HFK-E6/E7-Puro-Zellen eine gegenüber der Parentalzelllinie verminderte Wachstumsgeschwindigkeit für K-E6/E7-Ras- und K-E6/E7-Puro-Zellen feststellbar.

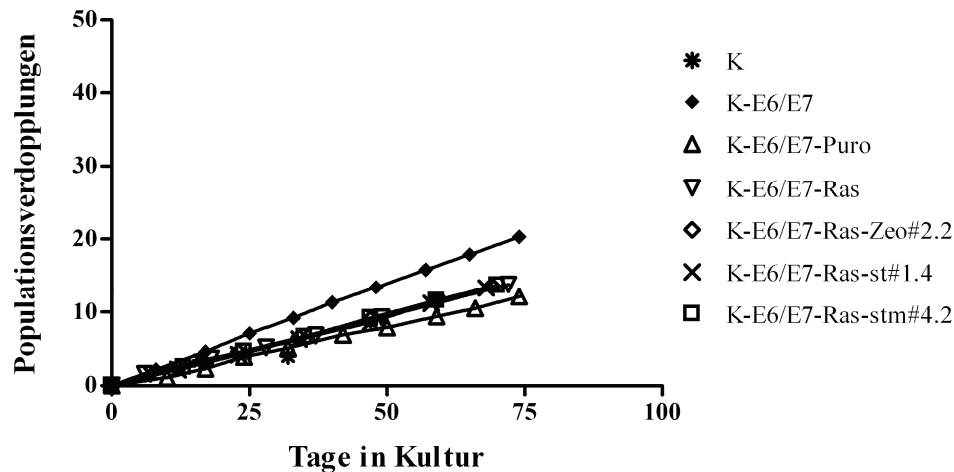


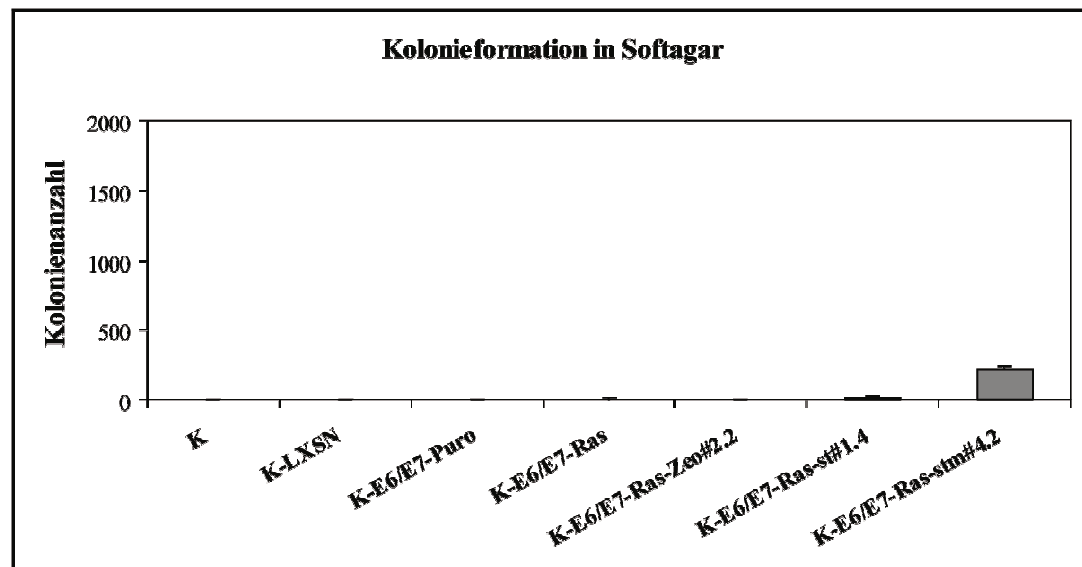
Abb. 20 Wachstumsverhalten von HPV16 E6/E7-, H-Ras- und SV40st-positiven humanen Vorhautkeratinozyten unter *in vitro* Bedingungen.

Dargestellt ist die Wachstumsrate der Zelllinien K (repräsentativ für K und K-LXSN), K-E6/E7, K-E6/E7-Puro, K-E6/E7-Ras, K-E6/E7-Zeo#2.2, K-E6/E7-Ras-st#1.4 und K-E6/E7-Ras-stm#4.2 über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen. Die Populationsverdopplungen bei jeder Passage wurden nach der Formel $\log_2[\text{Gesamtzellzahl}/\text{ausgesäte Zellzahl}]$ bestimmt und dem zeitlichen Verlauf entsprechend aufsummiert.

Des Weiteren waren auch die K-E6/E7-Ras-Zellen nicht in der Lage, Kolonien in Softagar oder Tumore nach subkutaner Injektion in immundefizienten Nacktmäusen zu bilden (vgl. **Abb. 21** und Daten nicht gezeigt).

Die Etablierung SV40 st-positiver K-E6/E7-Ras-Zellen gestaltete sich ähnlich schwierig wie für die HFK-E6/E7-Ras-Zellen: Nur aus 14 % der Ansätze gingen Zeocin-resistente Zellen hervor und lediglich in einer polyklonalen Population (#1.4) konnte eine SV40 st-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Diese Zelllinie wurde für alle weiteren Versuche eingesetzt. Die Transfektion der K-E6/E7-Ras-Zellen mit pBABEzeo-st1-110 bzw. pBABEzeo war hingegen deutlich effizienter: Alle Transfektionsansätze führten zu Zeocin-resistenten Klonen, von denen 80 % positiv auf SV40 stm-mRNA-Expression getestet werden konnten. Nachfolgend ist stellvertretend für alle SV40 stm-exprimierenden Zelllinien die Zelllinie K-E6/E7-Ras-stm#4.2 dargestellt. Die Zelllinien, die durch Transfektion mit dem pBABEzeo-Leervektor entstanden sind, werden durch K-E6/E7-Ras-Zeo#2.2 repräsentiert. Zunächst wurden alle Zelllinien auf ihr Expressionsverhalten bzgl. HPV16 E6/E7, p53, H-Ras, c-Myc und hTERT überprüft. Wie Abb. 18 veranschaulicht, zeigten alle Zelllinien eine deutliche Expression von HPV16 E6/E7, H-Ras, c-Myc und hTERT. Der TRAP-ELISA ergab für K-E6/E7-Ras-st#1.4, K-E6/E7-Ras-stm#4.2 und K-E6/E7-Ras-Zeo#2.2 erwartungsgemäß eine hohe Telomerase-Aktivität (s. **Abb. 19**).

A



B

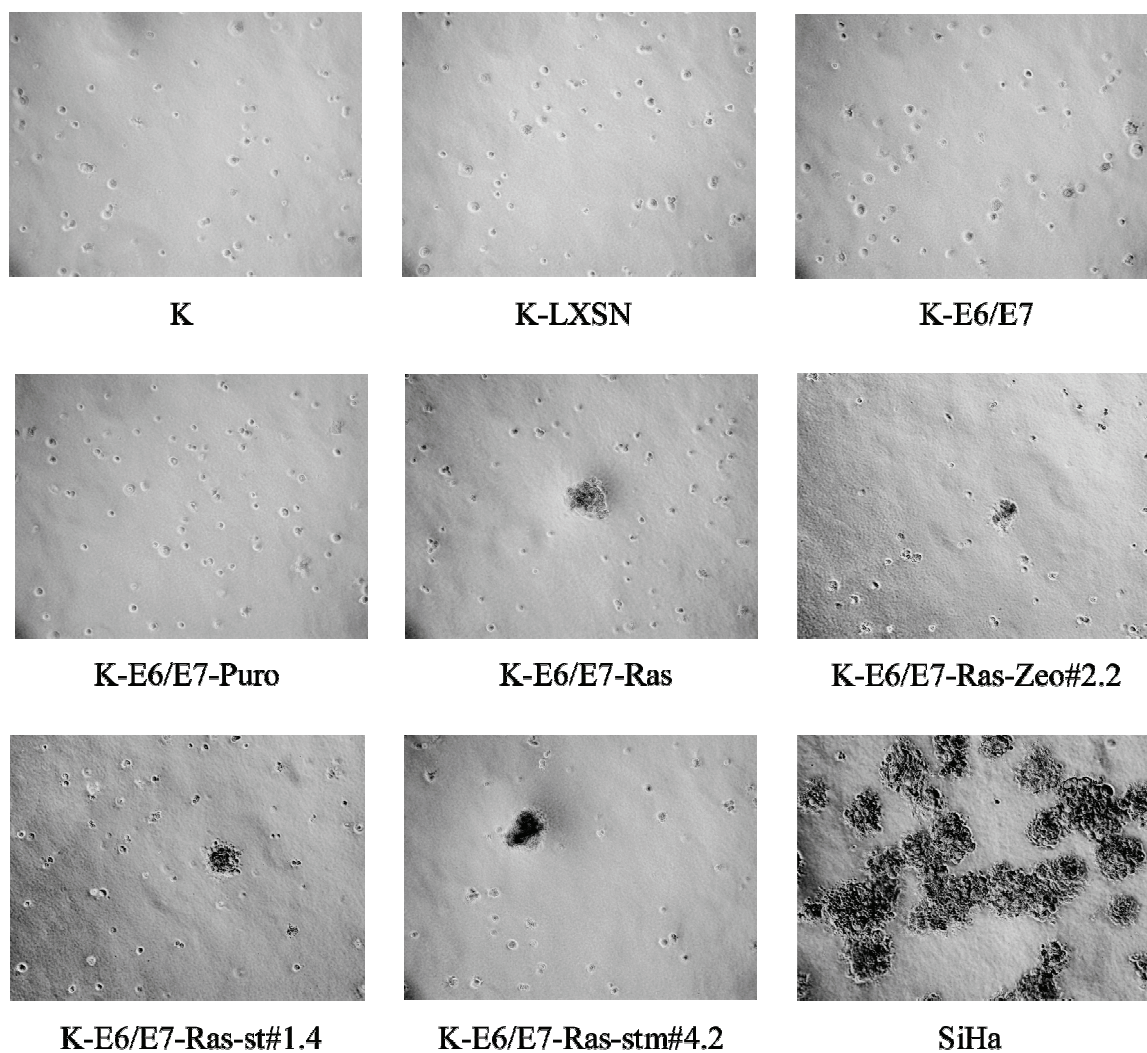


Abb. 21 Untersuchung von HPV16 E6/E7-, H-Ras- und SV40 st-positiven humanen Vorhautkeratinozyten auf ihre kolonienbildende Eigenschaft.

Je 2×10^5 Zellen wurden in einer zweischichtigen semisoliden Agar-Matrix ausgesät und über drei Wochen kultiviert. SiHa-Zellen dienten als Positivkontrolle. (A) Quantifizierung von jeweils 4 Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken. Es gingen alle Kolonien $\geq 0,2$ mm Durchmesser in die Auswertung ein. Bei mehr als 50 Kolonien pro Platte wurden 8 repräsentative, 25 mm^2 große Quadrate ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. Von SiHa-Zellen gebildete Kolonien wurden wegen der hohen Dichte nicht quantifiziert. (B) Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte, die nach 21 Tagen bei 25facher lichtmikroskopischer Vergrößerung aufgenommen wurden.

Bezüglich des *in vitro* Wachstums verhielten sich alle Zelllinien ähnlich ihren Vorgängerzelllinien K-E6/E7 und K-E6/E7-Ras (s. **Abb.20**). Im Softagarassay zeigten lediglich die K-E6/E7-Ras-stm#4.2 eine gering ausgeprägte Fähigkeit zur Koloniebildung vergleichbar der der HF-K-E6/E7-Ras-stm-Zelllinien (s. **Abb. 21**). Darüber hinaus führte die subkutane Injektion von jeweils 5×10^6 Zellen plus Matrigel in die Flanken von immundefizienten Nacktmäusen zu keiner Tumorbildung (ohne Abb.). Allerdings wurde festgestellt, dass nach wenigen Passagen in Zellkultur die mRNA-Expression von SV40 st in den K-E6/E7-Ras-st#1.4-Zellen nicht mehr detektierbar war. Dies war möglicherweise die Hauptursache dafür, dass für K-E6/E7-Ras-st#1.4 weder eine SV40 st-Proteinexpression noch tumorigene Eigenschaften im Softagarassay bzw. im Nacktmausversuch nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend ließen sich keine humanen Vorhautkeratinozyten generieren, die sowohl HPV16 E6/E7, H-Ras als auch SV40 st stabil exprimieren. Ein negativer Einfluss des eingesetzten pBABEzeo-Vektorsystems auf den Transfektionserfolg kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da auch unter Verwendung des pWZLblast-Vektors keine HPV16 E6/E7 + H-Ras + SV40 st-positiven humanen Vorhautkeratinozyten etabliert werden konnten. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass sich Vorhautkeratinozyten, die HPV16 E6/E7, H-Ras und die verkürzte SV40 st-Variante zusammen exprimieren, leichter etablieren ließen und eher stabil blieben. Diese Beobachtungen geben Grund zu der Annahme, dass die Aktivität der viralen Onkoproteine – HPV16 E6 und E7 auf der einen Seite sowie SV40 st auf der anderen Seite – derart miteinander interferiert, dass humane Vorhautkeratinozyten nicht fähig sind zu überleben, wenn diese Faktoren gleichzeitig exprimiert werden. Somit scheint die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7, H-Ras und SV40 st in humanen Vorhautkeratinozyten weniger ein Wachstumsvorteil als viel mehr ein Wachstumsnachteil zu sein.

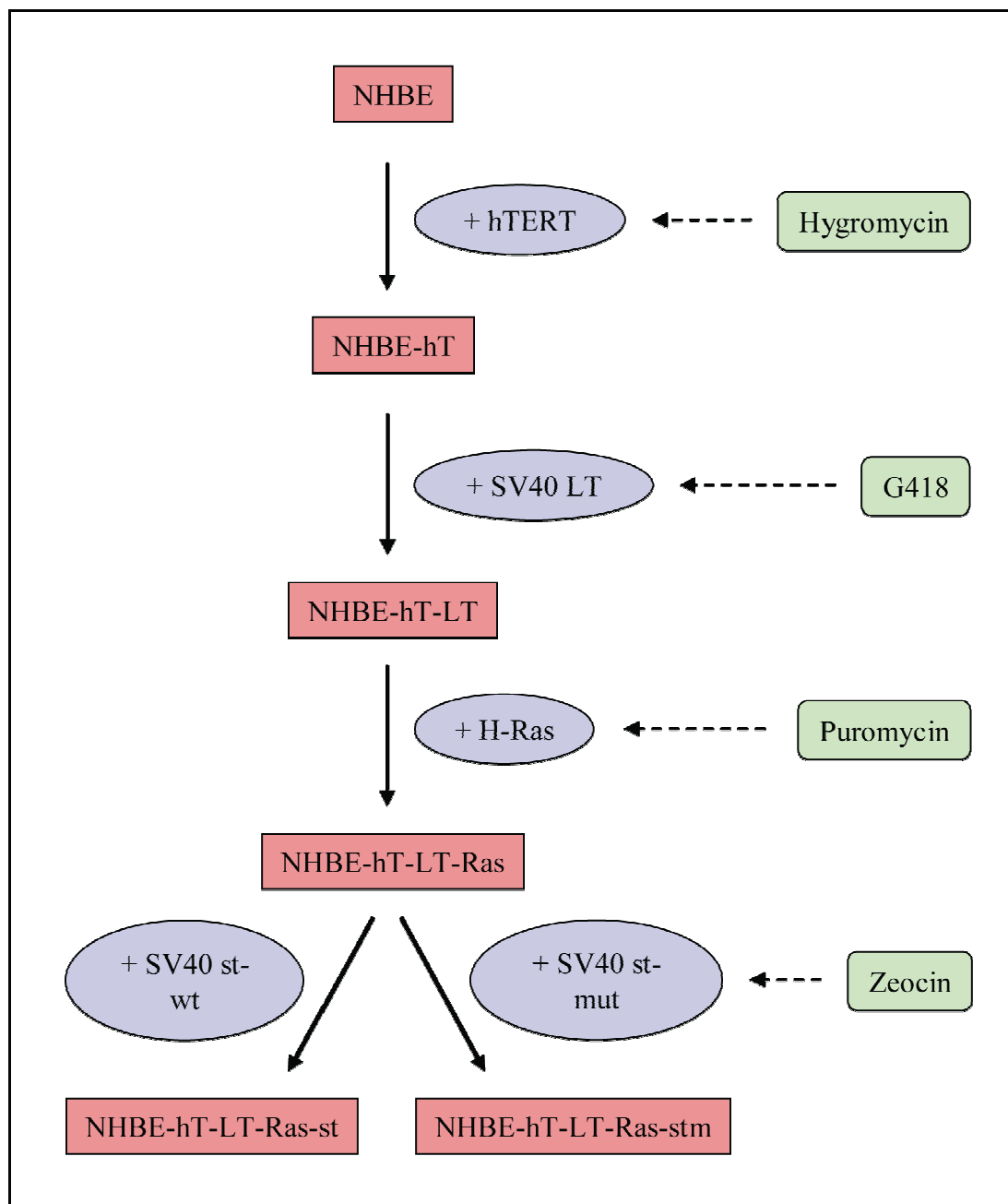


Abb. 22 Schematische Darstellung der Transfektionsstrategie zur Generierung hTERT, SV40 LT, H-Ras, und SV40st-positiver humaner Bronchialepithelzellen.

Ausgangspunkt waren normale humane Bronchialepithelzellen (NHBE), die bereits retroviral transfiziert waren (dünne Pfeile), wodurch eine Expression von hTERT, SV40 LT sowie H-Ras induziert worden war (NHBE-hT-LT-Ras). Eine anschließende Transfektion mit pBABEzeo-Derivaten (dicke Pfeile) und anschließender Selektion Zeocin-resistenter Klone sollte in der zusätzlichen Expression von SV40 st (Wildtyp bzw. Mutante) resultieren.

4.3.5. Charakterisierung der Zelllinien NHBE-hT-LT und NHBE-hT-LT-Ras

Analog den humanen Vorhautkeratinozyten sollte auch für normale humane Bronchialepithelzellen (NHBE) überprüft werden, ob durch Modulierung der Telomerase-, p53-, Rb-, H-Ras- und PP2A-abhängigen Signalwege eine maligne Transformation induziert werden würde. Die HPV16-Onkogene E6 und E7, die in den humanen Vorhautkeratinozyten als genetische Elemente zur Aktivierung der Telomerase und zur Inhibition von p53 und Rb verwendet worden waren, wurden in den humanen Bronchialepithelzellen durch hTERT und SV40 LT ausgetauscht – zum einen, weil HPV16 natürlicherweise nur selten Bronchialepithelzellen infiziert (Gerein *et al.*, 2007) und zum anderen, weil auch für NHBE-Zellen eine wachstumsinhibierende Interferenz zwischen HPV16 E6/E7 und SV40 st, wie sie für humane Vorhautkeratinozyten beobachtet worden war (s. vorangegangene Kapitel), nicht ausgeschlossen werden konnte. **Abb. 22** zeigt schematisch die experimentelle Strategie zur Transformation der humanen Bronchialepithelzellen.

Die Zelllinien NHBE-hT-LT und NHBE-hT-LT-Ras, die nach sequenzieller retroviraler Transfektion hTERT und SV40 LT bzw. hTERT, SV40 LT und H-Ras exprimierten, wurden von Prof. B. Rollins vom Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA zur Verfügung gestellt. Sie wurden zunächst bzgl. der Expression von hTERT, SV40 LT und H-Ras untersucht. Wie **Abb. 23** veranschaulicht, exprimierten beide Zelllinien die jeweils eingebrachten Gene bzw. cDNAs. Des Weiteren ergab der TRAP-ELISA für beide Zelllinien erwartungsgemäß eine starke Telomerase-Aktivität. Darüber hinaus wurde in den H-Ras-positiven humanen Bronchialepithelzellen wie schon in den humanen Vorhautkeratinozyten (vgl. **Abb. 24**) eine starke c-Myc-Expression nachgewiesen. Beide NHBE-Zelllinien zeigten über 2,5 Monate ein gleichmäßiges Wachstum in Zellkultur (s. **Abb. 25**). Während allerdings NHBE-hT-LT-Zellen keine Kolonien in Softagar bildeten, wurde für NHBE-hT-LT-Ras-Zellen eine gering ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonieformation beobachtet (s. **Abb. 26**). Dennoch konnte für keine der beiden Zelllinien eine Tumorentwicklung in immundefizienten Nacktmäusen nach subkutaner Injektion unter Zusatz von Matrigel festgestellt werden (ohne Abb.). Demnach müssen weitere genetische Veränderungen vorliegen, um in hTERT-, SV40 LT- und H-Ras-exprimierenden Bronchialepithelzellen einen tumorigenen Phänotyp zu induzieren.

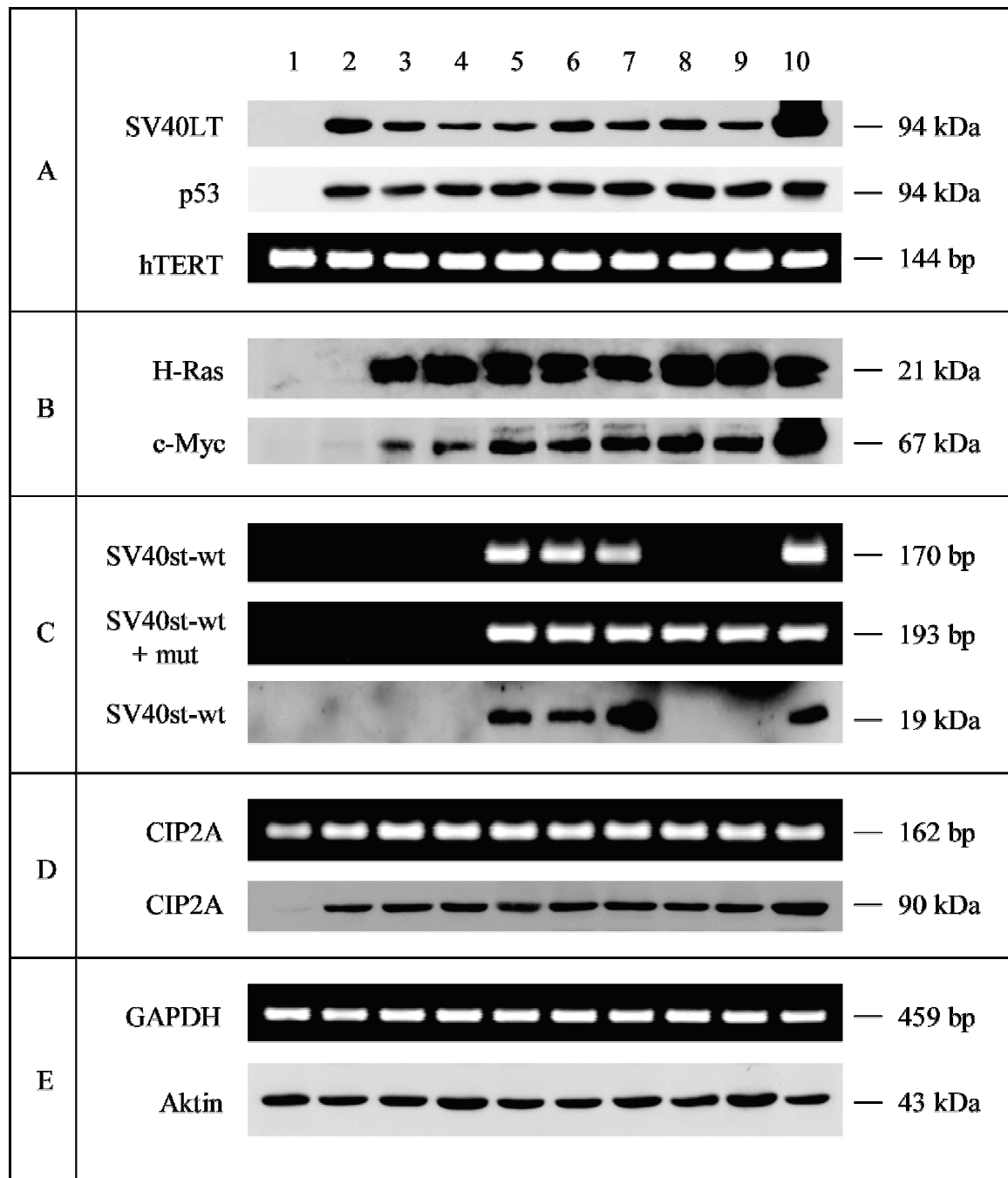


Abb. 23 Expression verschiedener zellulärer und viraler Onkogene in hTERT, SV40 LT und H-Ras-positiven humanen Bronchialepithelzellen (NHBE-hT-LT-Ras) nach Transfektion mit SV40 st-Wildtyp- bzw. Mutante-tragenden retroviralen Vektoren.

Die Expression der angegebenen Gene wurde auf mRNA-Ebene und/oder Proteinebene untersucht. Die mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von 1 µg Gesamt-RNA und Sequenz-spezifischen Primern ermittelt. (Die SV40st-mut-Primer binden sowohl Transkripte des Wildtyp- als auch Mutantengens.) Die Proteinexpression wurde anhand von Western blot-Analysen mit Protein-spezifischen Antikörpern unter Einsatz von jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakt bestimmt. Als Ladekontrollen sind eine repräsentative RT-PCR-Reihe für GAPDH und eine repräsentative Western blot-Analyse für Aktin gezeigt. Folgende Zelllinien wurden als Positivkontrollen verwendet: SV-52 (SV40 LT), SiHa (hTERT), HaCaT (p53), NHBE-hT-LT-Ras (H-Ras) HeLa (c-Myc, CIP2A), HEK-E6/E7-TRST (SV40st wt + mut). Molekulargewichte und Fragmentgrößen sind angegeben. 1) NHBE, 2) NHBE-hT-LT, 3) NHBE-hT-LT-Ras, 4) NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1.2, 5) NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1, 6) NHBE-hT-LT-Ras-st#1.2, 7) NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4, 8) NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2, 9) NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.4, 10) Pos. Kontr.

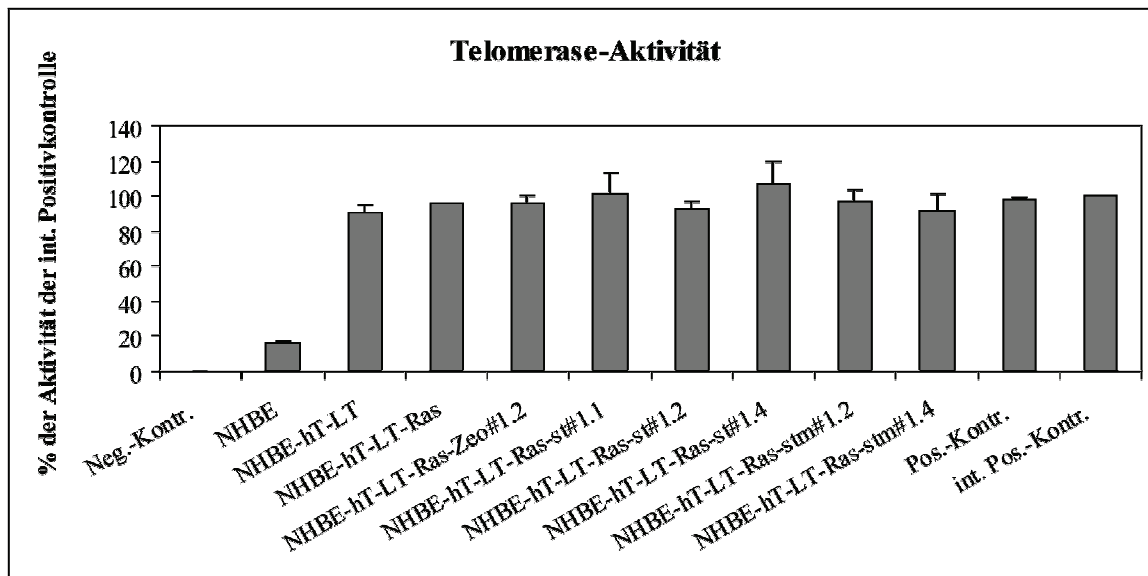


Abb. 24 Ermittlung der Telomerase-Aktivität von hTERT-, SV40 LT-, H-Ras- bzw. SV40 st-exprimierenden humanen Bronchialepithelzellen.

Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen für die Messung der Telomerase-Aktivität unter Verwendung eines TRAP-basierenden ELISA-Kitsystems (Roche) eingesetzt. Die bei 450 nm gemessenen Absorptionswerte entsprechen der enzymatischen Aktivität. Die Telomerase-Aktivität der Proben wurde zu der der internen Positivkontrolle (int. Pos.-Kontr.; vom Hersteller mitgeliefert) in Beziehung gesetzt und ist in Prozent angegeben. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Gezeigt sind die Daten aus zwei Experimenten mit Doppelbestimmungsansätzen. SiHa-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet.

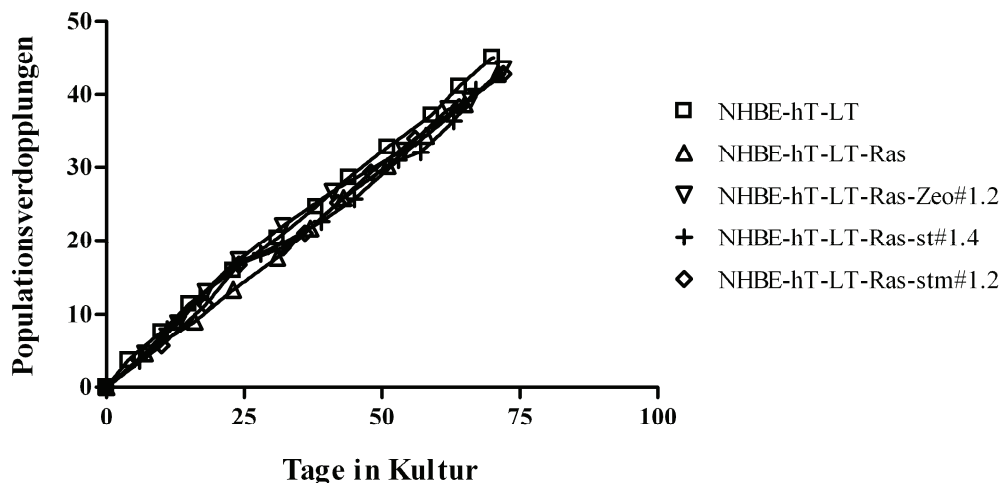


Abb. 25 Wachstumsverhalten von hTERT-, SV40 LT-, H-Ras- bzw. SV40 st-exprimierenden humanen Bronchialepithelzellen unter *in vitro* Bedingungen.

Gezeigt ist das *in vitro* Wachstum der Zelllinien NHBE-hT-LT, NHBE-hT-LT-Ras, NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4 (repräsentativ für NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1, 1.2 und 1.4) sowie NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 (repräsentativ für NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 und 1.4). Über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen wurden die Populationsverdopplungen bei jeder Passage bestimmt ($PD_{pp} = \log_2[\text{Gesamtzellzahl}/\text{ausgesäte Zellzahl}]$) und dem zeitlichen Verlauf entsprechend aufsummiert.

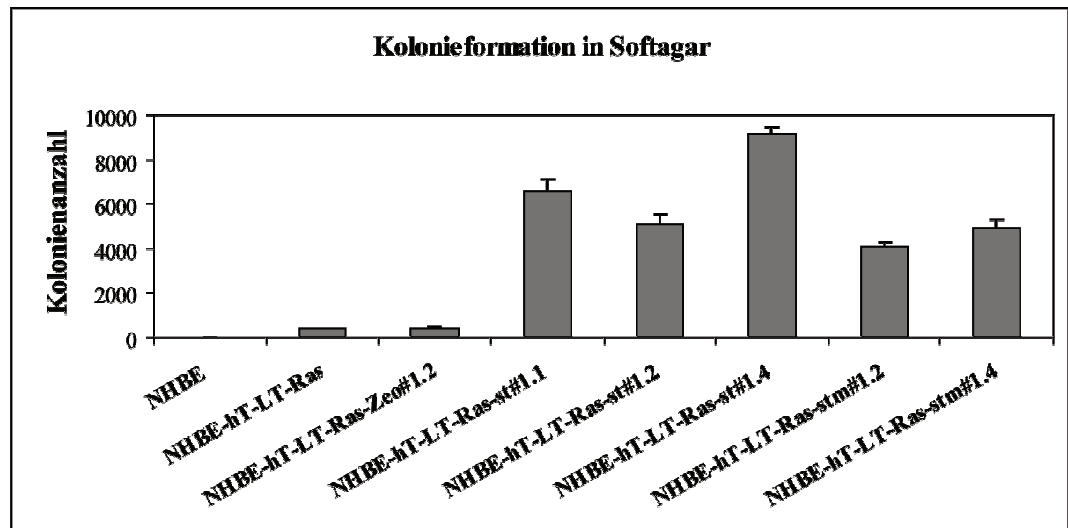
4.3.6. Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st

Um zu testen, ob eine Expression von SV40 st zusätzlich zur Expression von H-Ras, SV40 LT und hTERT eine maligne Transformation in humanen Bronchialepithelzellen auslöst, wurden die NHBE-hT-LT-Ras-Zellen ähnlich den humanen Vorhautkeratinozyten-Zelllinien K-E6/E7-Ras und HFK-E6/E7-Ras (vgl. Kapitel 4.3.3 und 4.3.4) mit den retroviralen Vektoren pBABEzeo, pBABEzeo-st bzw. pBABEzeo-st1-110 transfiziert. Durch Zeocingabe selektierte Zellen wurden als polyklonale Kultur erhalten und erhielten entsprechend die Bezeichnungen NHBE-hT-LT-Ras-Zeo, NHBE-hT-LT-Ras-st bzw. NHBE-hT-LT-Ras-stm. Nachfolgend sind exemplarisch die Ergebnisse für die Zelllinien NHBE-hT-LT-Ras-Zeo#1.2, NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1, #1.2, und #1.4 sowie NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 und #1.4 erläutert.

Wie **Abb. 23** zeigt, konnte für alle pBABEzeo-st- bzw. pBABEzeo-st1-110-transfizierten Zellen eine SV40 st-Expression nachgewiesen werden. Zudem wurden alle zuvor eingebrachten Gene bzw. cDNAs weiterhin stabil exprimiert (s. **Abb. 23**). Eine hohe Telomerase-Aktivität ähnlich der der Parentalzelllinie konnte ebenfalls bestimmt werden (s. **Abb. 24**). Alle immortalisierten Bronchialepithelzelllinien zeigten ein nahezu identisches Wachstumsverhalten in Zellkultur (s. **Abb.25**).

Während die primären sowie die durch hTERT und SV40 LT-Expression immortalisierten NHBE-Zellen nicht fähig waren, Kolonien in Softagar zu formen, konnte für die NHBE-Zellen, die neben hTERT, SV40 LT auch H-Ras exprimierten, eine Kolonieformation unter gleichen Bedingungen beobachtet werden (s. **Abb. 26**). Allerdings waren sowohl die SV40 st- als auch die SV40 st1-110-positiven Bronchialepithelzelllinien in der Lage, eine weitaus größere Anzahl an Kolonien in Softagar zu formen: Im Vergleich zu den NHBE-hT-LT-Ras- und den NHBE-hT-LT-Ras-Zeo-Zellen wurde hier etwa das 10-20fache an Kolonien gezählt. Auffallend ist eine gewisse Varianz zwischen den einzelnen SV40 st-positiven Populationen: Die Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4 bildete durchschnittlich etwa ein Drittel mehr Kolonien als die Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1 und ca. doppelt so viele Kolonien wie die Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st#1.2. Letztere lag damit eher im Bereich der Kolonienanzahl, die im Mittel für die SV40 st-Mutante-exprimierenden NHBE-Zelllinien ermittelt wurde.

A



B

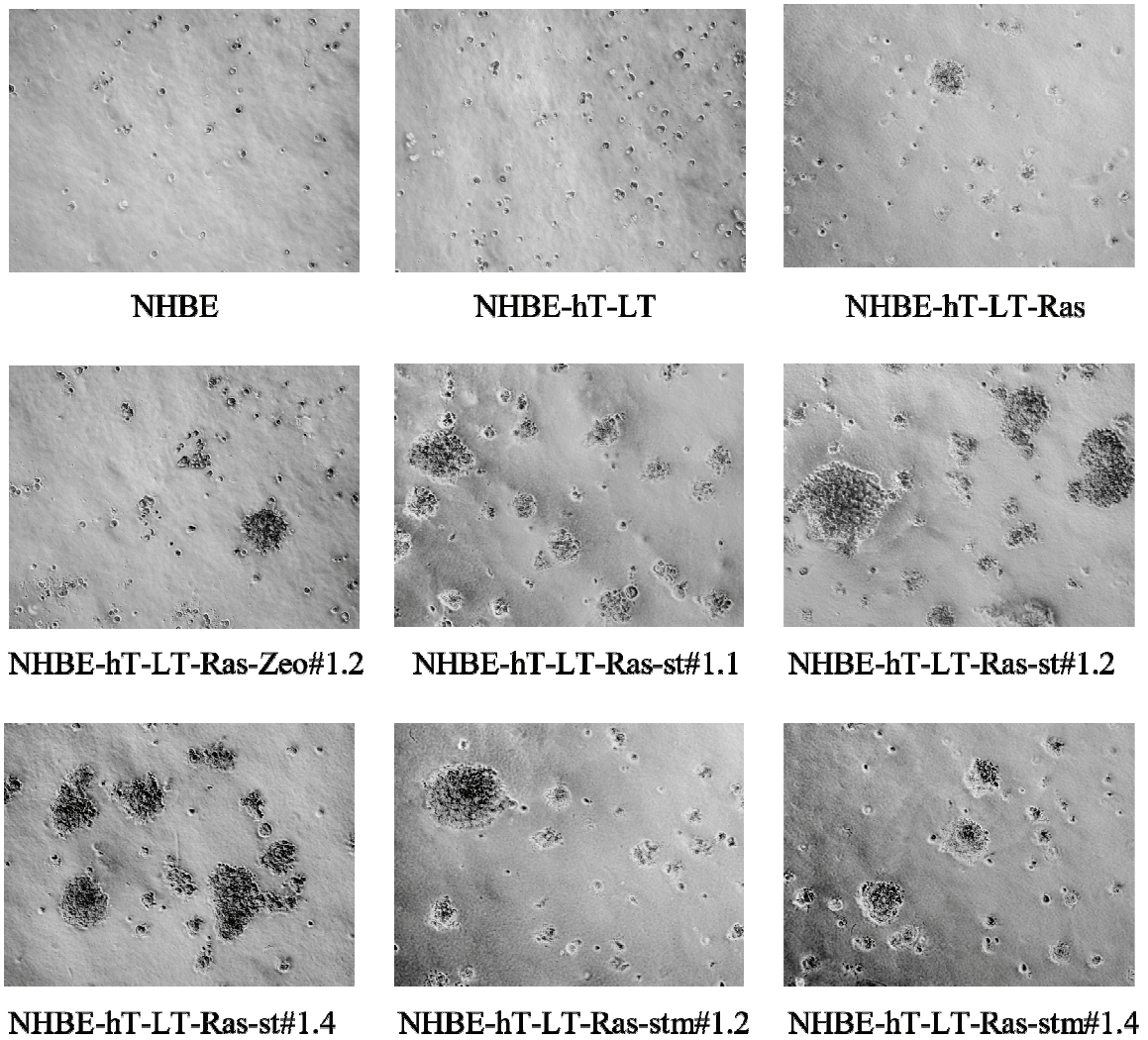


Abb. 26 Analyse der kolonienbildenden Fähigkeit von hTERT-, SV40 LT-, H-Ras- bzw. SV40 st-exprimierenden humanen Bronchialepithelzellen.

Es wurden 2×10^5 Zellen für einen Softagarassay eingesetzt. Nach drei Wochen erfolgte die Auswertung unter dem Lichtmikroskop. (A) Es wurden alle Kolonien mit einer Mindestgröße von 0,2 mm ausgezählt. Bei mehr als 50 Kolonien pro Platte wurden 8 repräsentative, 25 mm² große Quadrate ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte von 4 Experimenten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (B) Es wurden alle Kolonien mit einer Mindestgröße von 0,2 mm ausgezählt. Bei mehr als 50 Kolonien pro Platte wurden 8 repräsentative, 25 mm² große Quadrate ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte von 4 Experimenten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für eine Aussage bezüglich des *in vivo* Wachstumsverhaltens lagen bis zur Abgabe dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Zelllinien NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4 und NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.4 vor, die mit Matrigel subkutan in immundefiziente Nacktmäuse eingespritzt wurden. Das *in vivo* Wachstum der Zelllinien NHBE-hT-LT-Ras-st#1.1 und #1.2 bzw. NHBE-hT-LT-Ras-stm#1.2 sowie der Effekt einer immunsuppressiven Bestrahlung der Versuchstiere vor der Injektion wird derzeit noch untersucht. Während die SV40 st-Mutante-exprimierenden Bronchialepithelzellen keine Tumorbildung induzierten, entwickelten Versuchstiere, denen die SV40 st-Wildtyp-exprimierenden Bronchialepithelzellen inokuliert wurden, in einem von sechs Fällen nach einer Latenzzeit von etwa 45 Tagen einen schnell wachsenden Tumor. Wie **Abb. 27** zeigt, handelte es sich bei diesem Tumor um ein undifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit zentralen Nekrosen. Der Wachstumsverlauf dieses Tumors ist in **Abb 28** grafisch dargestellt.

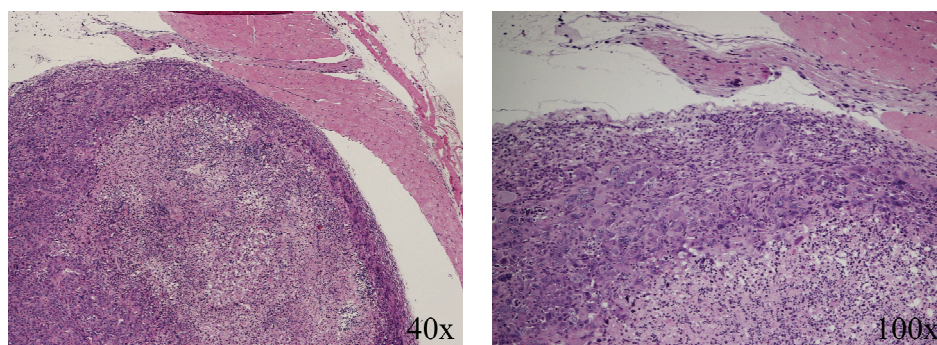


Abb. 27 Histologischer Aufbau des durch subkutane Injektion von NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4-Zellen in immundefiziente Nacktmäuse induzierten Tumors.

Dargestellt ist eine HE-Färbung des Tumorgewebes mit angrenzendem Mausgewebe bei 40facher bzw. 100facher Vergrößerung.

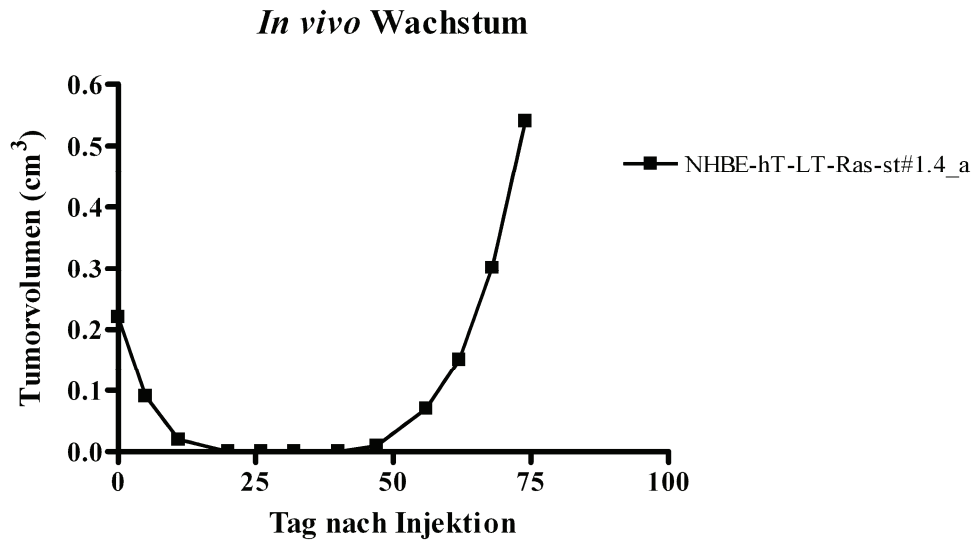


Abb. 28 Wachstumsverlauf eines durch subkutane Inokulation von hTERT-, SV40 LT-, H-Ras- und SV40 st-exprimierenden humanen Bronchialepithelzellen in immundefizienten Nacktmäusen induzierten Tumors.

5×10^6 Zellen der Zelllinie NHBE-hT-LT-Ras-st#1.4 wurden zusammen mit Matrigel subkutan in 6-8 Wochen alte immundefiziente Nacktmäuse injiziert. Das Tumorzvolumen wurde durch Ausmessen in zwei Dimensionen unter Verwendung der Formel $\frac{4}{3}\pi r^3$ (r = Radius) bestimmt.

Da nur bei einem von sechs Injektionsereignissen eine Tumorentwicklung auftrat, fand vermutlich erst unter *in vivo* Bedingungen eine Selektion der Zellen statt, die einen vollständig ausgeprägten tumorigenen Phänotyp hatten. Demnach kann man zusammenfassend festhalten, dass normale Bronchialepithelzellen, die hTERT, H-Ras, SV40 LT und SV40 st-Wildtyp exprimieren, sowohl das Potenzial besitzen, unabhängig von einer Verankerungsmatrix zu wachsen als auch Tumore in immundefizienten Nacktmäusen zu bilden.

4.3.7. Bedeutung von CIP2A für die maligne Transformation humaner Epithelzellen

In vielen Modellsystemen wurde SV40 st als eines der genetischen Elemente verwendet, deren kombinierte Expression in verschiedenen humanen Zelltypen ein tumorigener Phänotyp *in vitro* induzieren konnte. Allerdings stellt die Expression der viralen Onkogene von SV40 ein eher artifizielles Ereignis dar, da eine natürliche Infektion von z.B. humanen Vorhautkeratinozyten mit SV40 sehr unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus wurde, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit humaner Vorhautkeratinozyten festgestellt, wenn gleichzeitig HPV16 E6/E7 und SV40 st exprimiert

wurden. Deshalb wurde nach einer Alternative zu SV40 st gesucht. Da die Hemmung der Proteinphosphatase 2A vermutlich die Haupteigenschaft von SV0 st im Zusammenhang mit der malignen Transformation humaner Zellen darstellt, erschien der kürzlich als endogener Inhibitor von PP2A beschriebene Faktor CIP2A (Junttila *et al.*, 2007) ein geeigneter Kandidat zu sein. Eine erste Testreihe zur Expressionsanalyse von CIP2A ergab jedoch eine starke mRNA- und Proteinexpression in diversen primären und immortalen Zellen, u.a. primären Vorhautkeratinozyten und allen aus ihnen hervorgegangenen immortalen Zelllinien (vgl. **Abb. 12** und **18**). Daher wurde von der Idee Abstand genommen, CIP2A in K-E6/E7-Ras- oder HFK-E6/E7-Ras-Zellen überzuexprimieren. Lediglich für primäre humane Bronchialepithelzellen konnte eine etwas geringere mRNA- und eine deutlich verminderte Proteinexpression festgestellt werden – sowohl im Vergleich zu NHBE-Zellen, in denen die Expression diverser zellulärer und viraler Onkogene induziert wurde (vgl. **Abb. 23**) als auch zu etablierten Bronchialkarzinomzelllinien, z.B. A549-Zellen (s. **Abb. 29**). Es wurde daher postuliert, dass CIP2A möglicherweise eine Bedeutung für die Überwindung der Seneszenz und die Immortalisierung normaler humaner Bronchialepithelzellen haben und somit eine Rolle in frühen Stadien der Entwicklung von Lungentumoren spielen könnte. Hierfür sprach auch das Ergebnis einer immunhistochemischen Analyse von normalen Bronchialepithelzellen im Vergleich zur Lungenkarzinomzelllinie A549, die in Zusammenarbeit mit Dr. M. Tötsch vom Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt wurde. Hierzu wurden Dünnschnittpräparate von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellen hergestellt, die sowohl einer HE-Färbung als auch einer immunhistochemischen Analyse der CIP2A-Expression unterzogen wurden. Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurde maschinell unter Standardbedingungen durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung von CIP2A erfolgte im Autostainer unter Verwendung des Zytomed PCLHRP-100 Kitsystems der Firma Zytomed entsprechend den Angaben des Herstellers. Wie **Abb. 30** veranschaulicht, konnte eine sichtlich stärkere CIP2A-Expression in der Tumorzelllinie gegenüber den normalen Bronchialepithelzellen detektiert werden.

Um zu testen, ob sich CIP2A als diagnostischer Marker bei der Differenzierung von Lungentumoren eignen könnte, wurden wiederum in Kooperation mit Dr. Tötsch einige Schnittpräparate Formalin-fixierter und in Paraffin eingebetteter Lungentumore analog den NHBE- und A549-Zellen immunhistochemisch bzgl. der CIP2A-Expression untersucht. Parallel dazu wurden von allen Präparaten HE-Färbungen durchgeführt.

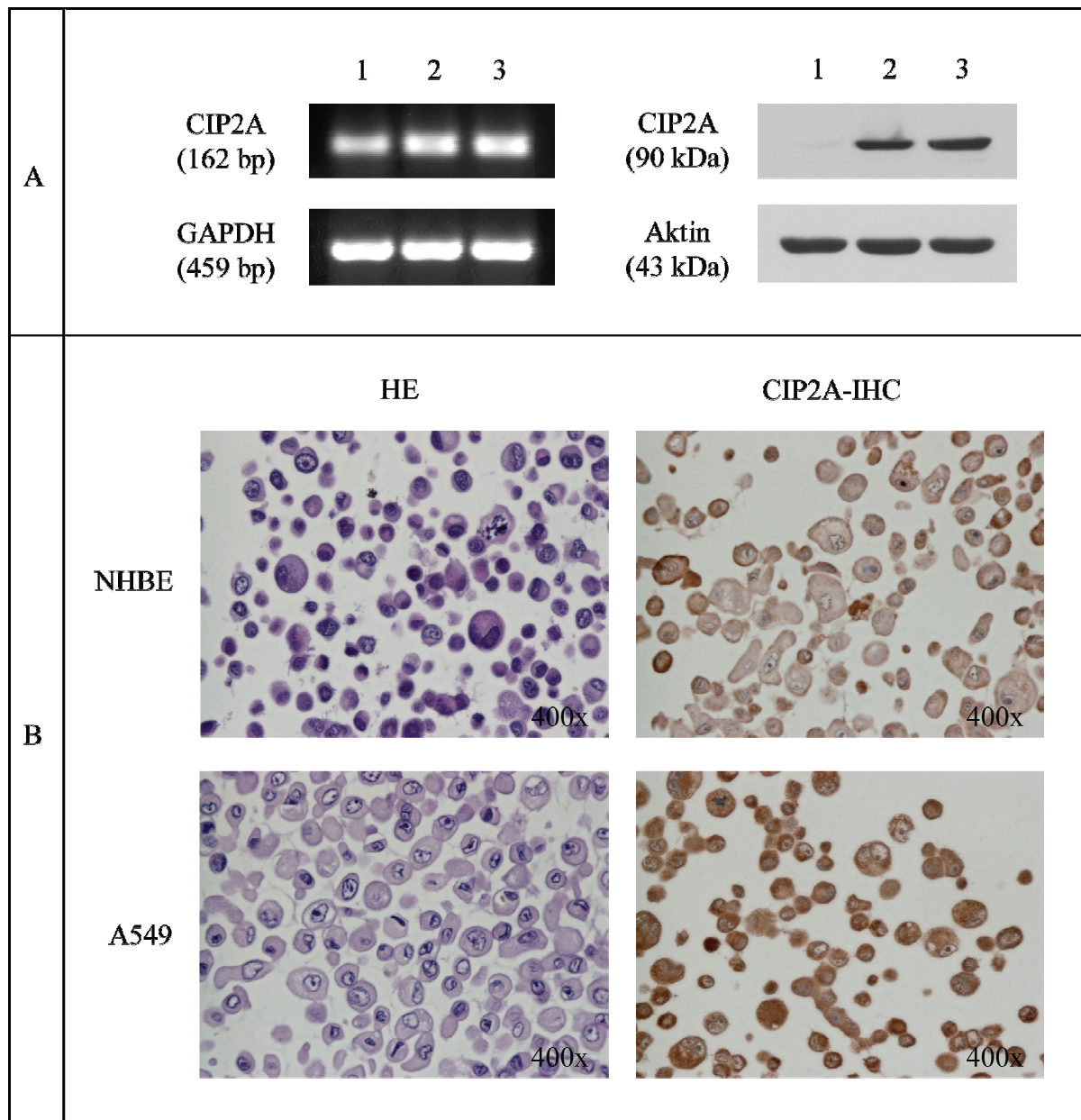


Abb. 29 Expression von CIP2A in der epithelialen humanen Bronchialkarzinomzelllinie A549 im Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE).

(A) Die mRNA-Expression von CIP2A (links) wurde mittels RT-PCR unter Verwendung Sequenz-spezifischer Primer, die Proteinexpression (rechts) anhand einer Western Blot-Analyse von jeweils 50 µg Protein unter Einsatz eines CIP2A-spezifischen Antikörpers bestimmt. GAPDH und Aktin dienten jeweils als Ladekontrollen. 1) NHBE, 2) A549, 3) Positivkontrolle (HeLa-Zellen)

(B) Dünnschnittpräparate von in Formalin konservierten und in Paraffin eingebetteten A549- und NHBE-Zellen wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) bzw. immunhistochemisch mit einem CIP2A-spezifischen Antikörper (CIP2A-IHC) angefärbt und bei einer 400fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

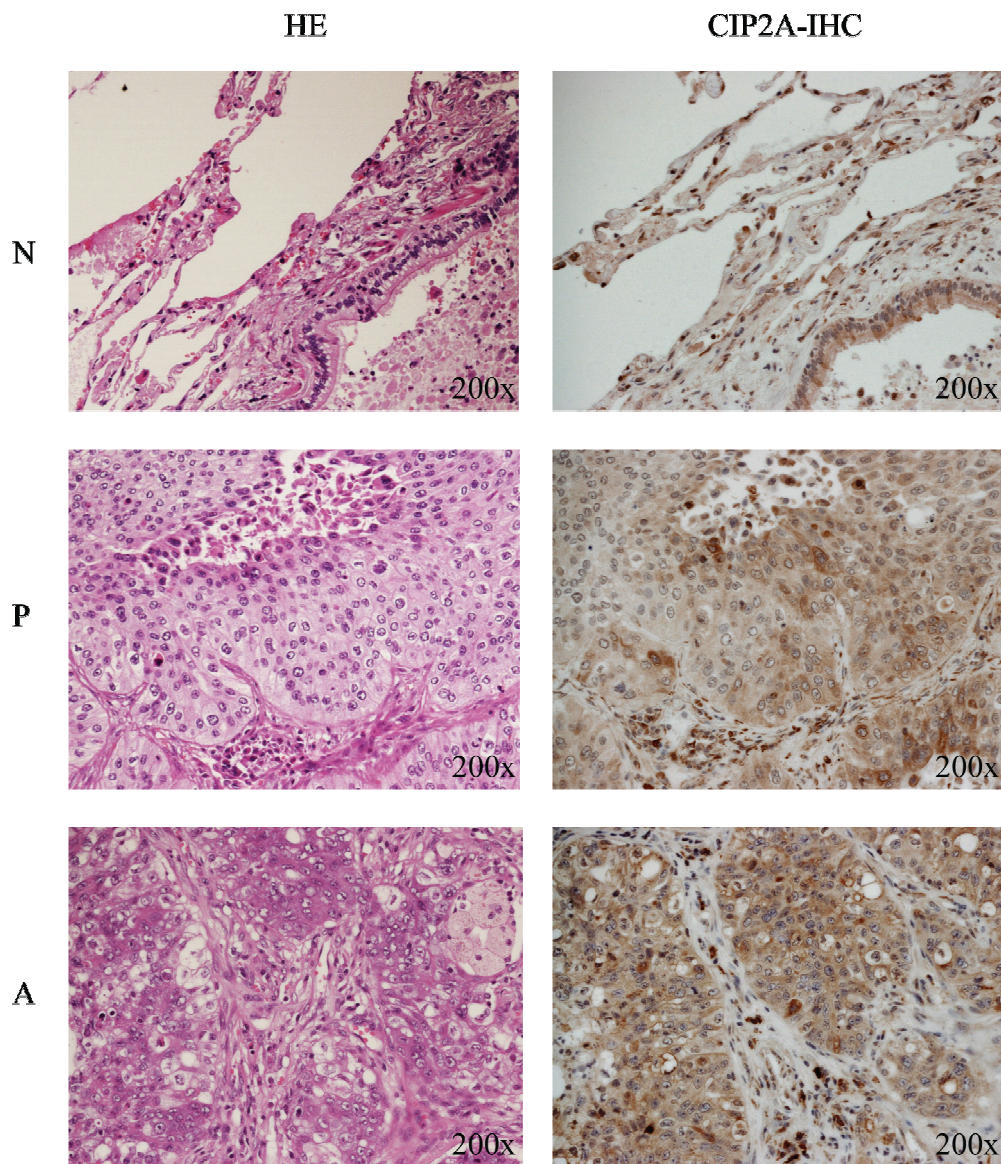


Abb. 30 CIP2A-Proteinexpression in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Dünnschnitte von einem Plattenepithelkarzinom (P) und einem Adenokarzinom (A) der Lunge wurden mit einem CIP2A-spezifischen Antikörper immunhistochemisch angefärbt (CIP2A-IHC). Parallel wurden dieselben Gewebeproben mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (HE). Die gezeigten Färbungen von Normalgewebe (N) entstammen entsprechenden Regionen der Plattenepithelkarzinom-Schnitte. Gesamtvergrößerung: 200x.

In Abb... sind die Ergebnisse zur immunhistochemischen Analyse der CIP2A-Expression eines Plattenepithelkarzinoms (P) und eines Adenokarzinoms (A) der Lunge im Vergleich zu normalem Bronchialgewebe zusammengefasst. Normale Bronchialepithelzellen wiesen eine diskrete CIP2A-Positivität auf, während die sie umgebenden Bindegewebssepten negativ waren. Bei den Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms ließ sich eine variable CIP2A-Expression erkennen. Im Adenokarzinom war demgegenüber eine homogene CIP2A-

Expression detektierbar. Sowohl im Plattenepithel- als auch im Adenokarzinom konnte darüber hinaus eine CIP2A-Positivität einzelner Makrophagen im Stroma festgestellt werden. Preliminäre Daten zeigen demnach in der Tat, dass CIP2A in normalem Bronchialepithelgewebe weniger stark exprimiert wird als in Plattenepithelkarzinomen oder Adenokarzinomen der Lunge. Somit gibt es erste Hinweise darauf, dass CIP2A nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* eine Rolle bei der Transformation humaner Bronchialepithelzellen spielen könnte. Weitere Analysen hierzu müssen zeigen, ob CIP2A ein verlässlicher neuer Marker für Lungentumore ist und über welche Mechanismen CIP2A einen Einfluss auf die Tumorentwicklung nimmt.

5. Diskussion

Die viralen Proteine E6 und E7 hochonkogener humaner Papillomvirustypen, wie z.B. HPV16 und HPV18, sind maßgeblich an der Entstehung und der Aufrechterhaltung des tumorigenen Phänotyps humaner Zervixkarzinomzellen beteiligt. Zur Studie der E6- und E7-Funktion hochonkogener HPV-Typen nach Infektion einer epithelialen Wirtszelle wurden von Aguilar-Lemarroy und Kollegen immortalisierte humane Vorhautkeratinozyten (HFK) etabliert, die nach retroviraler Transfektion die E6- und E7-Onkoproteine von HPV16 einzeln oder in Kombination exprimieren und die im Folgenden HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 genannt werden (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002). Diese Zelllinien wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit als *in vitro* Modellsystem genutzt, um bisher unbekannte zelluläre Gene zu identifizieren, die infolge der Expression von HPV16 E6, E7 bzw. E6/E7 differenziell exprimiert werden. Des Weiteren sollten diese in ihrer Expression veränderten Gene dahingehend überprüft werden, ob sie sich als neue diagnostische Marker bei der histopathologischen Begutachtung und Klassifizierung zervikaler Neoplasien und Tumore eignen würden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich in HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten durch zusätzliche Expression von Wachstumsregulatoren wie H-Ras und c-Myc sowie Inhibitoren der Proteinphosphatase 2A wie SV40 st bzw. CIP2A eine maligne Transformation unter *in vitro* Bedingungen induzieren lassen würde. Mit diesem Ansatz sollte analysiert werden, welche zellulären Faktoren neben den viralen Onkoproteinen E6 und E7 für die Entstehung epithelialer Tumore nach einer Infektion mit hochonkogenen HPV-Typen notwendig sind. Dieser Ansatz wurde auch auf humane Bronchialepithelzellen ausgeweitet: Hier wurde untersucht, ob die Modulation hTERT-, p53-, Rb-, Wachstumsfaktor- und PP2A-regulierter zellulärer Signalwege durch die kombinierte Expression von hTERT, H-Ras/c-Myc, SV40 LT und SV40 st/CIP2A einen tumorigenen Phänotyp in diesen Zellen induzieren würde.

5.1. Die Expression von HPV16 E6 und/oder E7 führt in humanen Vorhautkeratinozyten unter *in vitro* Langzeitkultivierungsbedingungen zu einem immortalen Phänotyp, einem veränderten Karyotyp, jedoch nicht zu einer malignen Transformation

Die langzeitkultivierten humanen Vorhautkeratinozyten-Zelllinien HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 wurden zunächst auf eine stabile Expression der viralen HPV16-Onkogene E6 und E7 überprüft. Es konnte eine ähnlich starke Expression der entsprechenden viralen Transkripte wie bei den HPV16-positiven Zervixkarzinomzelllinien SiHa und CaSki detektiert werden. Für HPV16 E6-positive Zellen konnte zudem erwartungsgemäß eine durch E6 induzierte p53-Proteindegradation verifiziert werden, vergleichbar der der Positivkontrollen SiHa und CaSki. Die erhöhte hTERT-mRNA-Expression und Telomerase-Aktivität dürfte in den HPV16 E6-positiven Zellen ebenfalls auf die Aktivität dieses viralen Proteins zurückzuführen sein. Da für das HPV16 E7-Protein bisher keine Telomerase-aktivierenden Eigenschaften beschrieben wurden, stellt die verstärkte hTERT-mRNA-Expression und Telomerase-Aktivität in den HFK-E7-Zellen vermutlich einen sekundären Effekt dar, der durch den hohen Selektionsdruck während der retroviralen Transfektion induziert wurde. Alle Vorhautkeratinozyten-Zelllinien konnten über einen Zeitraum von 2,5 Monaten ohne beobachtete Wachstumsdefizite unter *in vitro* Bedingungen kultiviert werden, daher können sie als immortale Zelllinien eingestuft werden.

Eine Karyotypanalyse ergab sowohl für die HPV16 E6- und HPV16 E7- als auch die HPV16 E6/E7-exprimierenden Vorhautkeratinozyten diverse chromosomale Veränderungen. Es gibt einige Studien zu chromosomalen Aberrationen, die mit der Expression der HPV16-Onkoproteine E6 und E7 in Zusammenhang gebracht werden. Beispielsweise wurde für Uroepithelzellen, die durch Expression von HPV16 E6 immortalisiert wurden, ein instabiler Karyotyp beschrieben, wobei die zufällig erscheinenden chromosomalen Rearrangements mit weitergehender Passagierung zunahmen (Reznikoff *et al.*, 1994, Vieten *et al.*, 1998). In diesen Zellen wurden zahlreiche klonale Deletionen in Chromosomenbereichen identifiziert, in denen Tumorsuppressorgene bzw. Seneszenz-assoziierte Gene vermutet werden, wie z.B. -3p, -6q, -9p. Im Gegensatz dazu zeigten durch HPV16 E7-Expression immortalisierte Uroepithelzellen minimale genotypische Veränderungen; auffällig waren lediglich eine Amplifikation von Sequenzen auf Chromosom 20q und eine gegenüber Kontrollzellen verstärkte Polyploidisierung in frühen Passagen. Die beschriebenen HPV16 E6- bzw. E7-

positiven Uroepithelzellen weisen jedoch keine übereinstimmenden chromosomalen Veränderungen mit den in dieser Arbeit analysierten HPV16 E6- bzw. E7-positiven Vorhautkeratinozyten auf. Eine zytogenetische Untersuchung humaner Vorhautkeratinozyten-Zelllinien, die das gesamte HPV16-Genom tragen, ergaben diverse chromosomale Aberrationen (Steenbergen *et al.*, 1996, McGhee *et al.*, 2006). Die für die 16-MT-Zelllinie gezeigte Trisomie von Chromosom 5 konnte auch in der hier getesteten Zelllinie HFK-E6 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte für die HPV16 E6- und E7-positiven Vorhautkeratinozyten ähnlich der 16-MT-Zelllinie ein Verlust von Chromosom 22 beobachtet werden. Ein Verlust von 10p wie für FK16-Zelllinien gezeigt, fand sich in den hier untersuchten HFK-E6/E7-Zellen. Andere Übereinstimmungen mit der 16-MT-Zelllinie oder den FK16-Zelllinien (z.B. -3p, -11q) konnten allerdings nicht festgestellt werden. Auch die in den HPV16-positiven Zervixkarzinomzelllinien SiHa und CaSki gefundenen massiven karyotypischen Veränderungen (Harris *et al.*, 2003) entsprechen nicht denen der hier analysierten HPV16 E6-, E7 und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten.

Die dargestellten Befunde legen nahe, dass die Aktivität der HPV16 E6- und E7-Proteine eher zu zufälligen chromosomalen Veränderungen und weniger zum Verlust der Integrität bestimmter chromosomaler Bereiche führt. Auch der Zelltyp, der experimentelle Prozess, durch den die immortalisierten humanen Keratinozyten generiert wurden sowie die Tatsache, ob nur die HPV16-Onkogene E6 und E7 einzeln bzw. in Kombination exprimiert werden oder ob das gesamte HPV16-Genom in der Zelle vorliegt, könnten schlussendlich in einem unterschiedlichen Spektrum zytogenetischer Veränderungen resultieren. Allerdings beziehen sich alle hier genannten Ergebnisse auf karyotypische Veränderungen, von denen große DNA-Bereiche betroffen sind. Für detailliertere Untersuchungen müssten sensitivere Methoden wie z.B. FISH (*fluorescence in situ hybridisation*)-, CGH (*comparative genomic hybridisation*)-, oder MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*)-Analysen herangezogen werden. Eine zytogenetische Studie mehrerer Klone HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-exprimierender Vorhautkeratinozyten würde zudem Aufschluss darüber geben, ob bei identischen Parametern (gleicher Zelltyp, übereinstimmender Ablauf des Immortalisierungsprozesses, Expression derselben viralen Onkogene) zumindest einige karyotypische Veränderungen wiederholt auftreten würden.

Für Keratinozyten, die durch Einbringen des gesamten Genoms immortalisiert wurden, ist beschrieben worden, dass nach Langzeitkultivierung tumorigene Klone entstehen können, (DiPaolo *et al.*, 1990). Trotz der langen Passagierung in Zellkultur und der Akkumulation diverser chromosomaler Aberrationen weisen die hier untersuchten HPV16 E6-, E7- bzw.

E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten-Zelllinien jedoch keine tumorigenen Eigenschaften auf, wie durch subkutane Injektion in immundefiziente Nacktmäuse unter Zusatz von Matrigel gezeigt werden konnte.

5.2. In HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten differenziell exprimierte zelluläre Gene könnten als neue Markergene für differenzialdiagnostische Analysen zervikaler Gewebeschnitte eingesetzt werden

5.2.1. In HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Keratinozyten werden überwiegend Gene differenziell exprimiert, deren Produkte einen Einfluss auf Zellzykluskontrolle, zelluläre Entwicklung und Differenzierung, Immunantwort, Apoptose, Zell-Zell-Kommunikation, Antwort auf DNA-Schäden und Angiogenese haben

Die Infektion des Genitaltrakts mit hochonkogenen Papillomvirustypen ist ein relativ häufiges Ereignis in der menschlichen Population. Dennoch werden nicht bei allen Frauen zervikale Dysplasien diagnostiziert und nur ein Bruchteil der betroffenen Personen entwickelt ein *Carcinoma in situ*. Um bei Patientinnen mit niedriggradigen CIN-Läsionen den möglichen Krankheitsverlauf, d.h. das Risiko an Gebärmutterhalskrebs zu erkranken, besser einschätzen zu können, sind differenzialdiagnostische Untersuchungen zervikaler Biopsien anhand von Markergenen hilfreich.

Eines der Teilprojekte dieser Arbeit hatte daher das Ziel, durch den Vergleich von HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten mit Leervektor-tragenden primären Vorhautkeratinozyten neue differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, die als Markergene für diagnostische Zwecke eingesetzt werden könnten. Um das veränderte Genexpressionsverhalten potenziell der Aktivität eines der beiden viralen Onkoproteine zuordnen zu können, wurden auch HPV16 E6- bzw. E7-positive humane Vorhautkeratinozyten in die Studie eingeschlossen. Eine hierfür als Ausgangspunkt durchgeführte Mikroarray-Analyse ergab für HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positive Vorhautkeratinozyten ein gegenüber pLXSN-transfizierten primären Vorhautkeratinozyten

differenzielles Expressionsprofil von etwa 3400 Genen, deren Produkte u.a. bei zellulären Prozessen wie der Zellzykluskontrolle, der Entwicklung und Differenzierung epithelialer Zellen, der Immunantwort, der Apoptose, der Zell-Zell-Kommunikation, der Reaktion auf DNA-Schädigungen oder der Angiogenese eine Rolle spielen. Beispielsweise konnte für Gene, deren Produkte für die Differenzierung von Keratinozyten wichtig sind (*IVL*, *KRT16*, *DCN*, *FLG*, *GDF15*, etc.), zur Auslösung einer Apoptosereaktion beitragen (z.B. *BCL2L1*, *CARD6*, *CARD15*, *ICEBERG*, *PCDP4*, *PCDP5*, *TNFSF10*) bzw. an zellulären Immunantworten beteiligt sind (z.B. *IFNK*, *IFNGR1*, *IL1A*, *IL1B*, *IL8*, *IL8RB*, *DEFB1*, *CXCL5*, *TNFSF9* und *TNFSF11*), sowohl in HPV16 E6-, E7- als auch E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten eine im Vergleich zur Leervektorkontrolle verminderte Expression festgestellt werden. Demgegenüber waren Gene, deren Produkte einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression haben (*CCNA1*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNF*, *CDC2*, *CDC25*, *CDK2*, *E2F5*, *E2F7* usw.) in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven Keratinozyten verglichen mit den HFK-LXSN-Zellen durch eine erhöhte Expression gekennzeichnet.

Dass HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positive humane Keratinozyten insbesondere in Bezug auf zelluläre Faktoren ein differenzielles Genexpressionsmuster aufweisen, die an so zentralen Prozessen wie der Immunantwort oder der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, ist nicht überraschend. Schließlich müssen humane Papillomviren für einen erfolgreich abgeschlossenen Replikationszyklus einerseits Differenzierungs- und Proliferationsmechanismen entkoppeln, andererseits aber Immunreaktions- und Apoptose-induzierende Signalwege in der Wirtszelle unterdrücken. Dennoch lassen sich aus den Daten der Mikroarray-Analyse neue Erkenntnisse ableiten, wie die viralen Onkoproteine E6 und E7 hochonkogener HPV-Typen, insbesondere HPV16, die Expression zellulärer Faktoren beeinflussen. Ein Vergleich der Genexpressionsprofile von HFK-E6, HFK-E7 und HFK-E6/E7 gegenüber HFK-LXSN erlaubt eine Aussage darüber, welches der HPV16-Onkogene aufgrund seiner Aktivität wahrscheinlich an der veränderten Expression einzelner Gene beteiligt ist. Beispielsweise waren *BINI*, *PRKCA*, *MMP19*, *THBS2* und *P53AIP1* in HPV16 E7- und E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten verglichen mit HFK-LXSN-Zellen gleichermaßen dereguliert, während in HPV16 E6-positiven Zellen keine veränderte Genexpression gefunden wurde. Dies würde für HPV16 E7 als treibende Kraft sprechen. Im Gegensatz dazu wurde z.B. in HFK-E6- und HFK-E6/E7-, nicht jedoch in HFK-E7-Zellen, eine im Vergleich zur Leervektorkontrolle erhöhte Genexpression für *CCNA1*, *KIF23*, *FOSB*, *MYBL2*, *RERG* und *BCL2L1* detektiert. Dies lässt eine hauptsächliche Rolle für HPV16 E6 im Zusammenhang mit der Deregulation dieser Gene vermuten. Des Weiteren ist ein

überlappender oder gar synergistischer Effekt für die Expression beider viraler Onkogene wahrscheinlich, wenn, wie z.B. für *FANCD2*, *HMGB2*, *CDC20*, *CENPE*, *KLK10*, *NOTCH3*, *KRT16*, *IVL*, *TNFSF10*, *BNIP3L* und *CXCL5*, ein übereinstimmendes Expressionsmuster in allen drei HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven oder nur in HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten festgestellt wurde. Eine antagonistische Wirkung von HPV16 E6 und E7 ist für solche Gene zu vermuten, die zwar in den Vorhautkeratinozyten differenziell exprimiert werden, die HPV16 E6 oder E7, nicht jedoch beide viralen Onkoproteine zusammen exprimieren. Beispiele hierfür wären *MCM7*, *MCM8*, *PAX6*, *PAX8*, *IGFBP4*, *IGFBP7*, *TNFSF11*, *MGMT*, *IL8*, *LDOC1*, *NALP1*, *NALP2*, *E2F5* und *E2F7*.

Ein Vergleich mit anderen Studien, in denen ebenfalls differenzielle Genexpressionsmuster nach Expression von HPV16 E6, E7 bzw. E6/E7 in humanen Keratinozyten analysiert wurden, zeigte diverse Übereinstimmungen auf. Duffy und Kollegen beschrieben beispielsweise, dass HPV16 E6 Differenzierungs-assoziierte Gene reguliert (Duffy *et al.*, 2003): Epidermale Differenzierungsmarker wie *SPRR1A*, *SPRR2B*, *KRT6B*, *KRT4*, *KRT13*, *KRT15*, *PI3*, *IVL*, *S100A9* oder *ECM1* wurden in HPV16 E6/E7-exprimierenden humanen Vorhautkeratinozyten deutlich stärker in ihrer Expression vermindert als in HPV16 E7-positiven Vergleichszellen. Demgegenüber wurden Gene wie z.B. *NFH*, *VIM* und *SPARC* in HPV16 E6-positiven Keratinozyten im Vergleich zu HPV16 E7-positiven Keratinozyten hochreguliert. Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Nees und Kollegen wiesen eine Beteiligung von HPV16 E6 und E7 an der negativen Regulation Interferon- bzw. NF-kappaB-abhängiger Gene nach, wobei E6 den stärkeren Einfluss hatte (Nees *et al.*, 2001). Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch für die hier vorgestellte Genexpressionsanalyse feststellen, beispielsweise für *IFI27*, *IFIT1*, *IFITM1*, *TNFSF10*, *MYD88* und *PLK2*.

Eine Mikroarray-Analyse von immortalisierten humanen Vorhautkeratinozyten, die das gesamte HPV16-Genom enthalten und von denen Wachstumsfaktor-unabhängige und differenzierungsresistente Subpopulationen *in vitro* selektiert wurden (Wan *et al.*, 2008), zeigt eine etwa 50%ige Übereinstimmungen mit dem in dieser Arbeit für HFK-E6/E7 erstellten Genexpressionsprofil, wobei ein ähnlich umfangreicher Genchip verwendet wurde. Zu den in ihrer Expression veränderten Genen, die von Wan *et al.* in HPV16-positiven Keratinozyten identifiziert wurden und die auch für HFK-E6/E7 zutreffen, zählen z.B. diverse an der Immunantwort beteiligte Faktoren, u.a. Interferon-regulierte Gene, die z.T. bereits von Nees *et al.* beschrieben wurden (*DEFB1*, *DEFB103A*, *ICEBERG*, *G1P2*, *G1P3*, *IFI27*, *IFI44*, *IFITM1*, *IFNK*, *MX1*, *MX2* u.a.), Gene, deren Produkte eine Rolle bei der zellulären

Proliferation bzw. Differenzierung und Entwicklung spielen und die z.T. bereits von Duffy *et al.* der Aktivität von E6 zugeschrieben wurden (z.B. *AREG*, *BAMBI*, *EHF*, *CDKN2A*, *TGFBI*, *KRT4*, *KRT13*, *KRT16*, *SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR3*, *IVL*, etc.) sowie Gene, die für proteolytische Faktoren kodieren (z.B. *KLK5*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK10*, *KLK12*, *SERPINB2*, *SERPINB7*). Die sich ergänzenden Befunde zeigen deutlich, dass auch die hier vorgestellte Mikroarray-Analyse ihren Beitrag zur Aufklärung HPV16-vermittelter Genexpressionsveränderungen leisten kann, die im Zusammenhang mit Immortalisierungs- und Tumorentwicklungsprozessen stehen.

5.2.2. Eine quantitative Real-Time-RT-PCR-Analyse bestätigt eine differenzielle Expression für verschiedene zelluläre Gene, u.a. *LDOC1*, *REGG*, *DCN* und *WNT4*

Für die Gene *DCN* (*decorin*), *DEFB1* (*defensin beta 1*), *IFNK* (*interferon kappa*), *LDOC1* (*leucine zipper, downregulated in cancer*), *MGMT* (*O6-methylguanidintransferase*), *REGG* (*ras-like, estrogen-regulated growth inhibitor*), *SPRR1B* (*small proline rich protein 1B*), *THBS2* (*thrombospondin 2*), *TNFSF10/TRAIL* (*TNF superfamily, member 10*; TRAIL), *TWIST1* (*twist homolog 1*), *WNT4* (*WNT family, member 4*) und *WT1* (*Wilm's tumor 1*) konnten die in der Mikroarray-Analyse ermittelten differenziellen Genexpressionsmuster mittels quantitativer Real-Time RT-PCR bestätigt werden.

Für *MGMT*, *TWIST1*, *TNFSF10*, *SPRR1B*, *DEFB1*, *IFNK* wurden bereits veränderte Genexpressionsmuster in HPV-assoziierten zervikalen Neoplasien im Vergleich zu Normalgewebe gezeigt und auch die Rolle der E6- und E7-Proteine hochonkogener HPV-Typen wurde vielfach bereits untersucht. Im Gegensatz dazu gibt es für *LDOC1*, *REGG*, *WNT4*, *DCN*, *WT1* und *THBS2* bisher kaum Hinweise auf eine Beteiligung an der Entwicklung HPV-assoziiierter Zervixkarzinome.

Für *LDOC1* ist eine verminderte Expression in Pankreaskarzinomzelllinien sowie eine Apoptose-induzierende Funktion in diversen humanen Tumorzelllinien beschrieben worden, die möglicherweise durch eine Inhibition der NFkappaB-Aktivierung vermittelt wird (Nagasaki *et al.*, 2003, Mizumoto *et al.*, 2006). Auch die hier untersuchten HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozytenzellen exprimierten weniger *LDOC1*-mRNA als die Leervektor-tragenden Vergleichszellen; die stärkste Deregulierung war allerdings in den Keratinozyten feststellbar, die nur das E6-Protein exprimieren. Ob die verminderte *LDOC1*-Expression tatsächlich einer Apoptose-Induktion entgegenwirkt, soll in

zukünftigen Experimenten u. a. durch Überexpression von LDOC1 in HPV16 E6-positiven Vorhautkeratinozyten und anschließenden Apoptose-Nachweistests ermittelt werden.

Für RERG konnte sowohl in den HPV16 E6- sowie E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten eine gegenüber der Leervektorkontrolle erhöhte Expression detektiert werden. RERG ist ein Östrogen-abhängig regulierter GDP/GTP-Bindefaktor. Zur genauen biologischen Funktion oder einer eventuellen Rolle von RERG bezüglich der Immortalisierung oder malignen Transformation humaner epithelialer Zellen ist bisher wenig bekannt. Lediglich für Mammakarzinomzellen ist eine verminderte Expression bzw. ein Verlust der RERG-Expression beschrieben (Finlin *et al.*, 2001). Möglicherweise ist die Funktion von RERG zelltypspezifisch. Denkbar wäre auch, dass die RERG-Expression erst in späteren Phasen einer zellulären Transformation abgeschaltet wird und somit die erhöhte Expression von RERG ein Merkmal präkanzerogener Zellen darstellt.

In HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten wurde im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine deutlich erhöhte mRNA-Expression für Decorin beobachtet. Decorin gehört zur Familie der kleinen Prolin-reichen Proteoglykane und reguliert Wachstum, Differenzierung und Überleben humaner Zellen. Eine Dysfunktion von Decorin steht im Zusammenhang mit diversen pathologischen Prozessen, z.B. Herzinfarkten (Mayo *et al.*, 1999), diabetischen Nephropathien (Schaefer *et al.*, 2002, Schaefer *et al.*, 2004, Bonifas *et al.*, 2001), Muskeldystrophien (Brandan *et al.*, 2008) sowie Krebszellwachstum und -migration (Iozzo *et al.*, 1995). Letzteres wird von Decorin über verschiedene Mechanismen beeinflusst: Zum einen kann es in Wachstumsfaktor-abhängige Signalkaskaden eingreifen, indem es an Wachstumsrezeptoren wie EGFR oder ErbB2 bindet und diese inhibiert (Iozzo *et al.*, 1995, Santra *et al.*, 2000, Santra *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2005). Zum anderen kann es mit Kollagen wechselwirken und so die Tumor-Stroma-Interaktion modulieren (Kamijo *et al.*, 1998, Mayo *et al.*, 1999, Keene *et al.*, 2000). Des Weiteren blockiert Decorin TGF-beta-abhängige Signalwege (Yamaguchi *et al.*, 1990, Mammas *et al.*, 2005, Cabello-Verrugio und Brandan, 2007). Es gibt zudem Hinweise auf eine anti-angiogene Wirkung von Decorin, die u. a. mit einer Suppression der VEGF-Expression in Verbindung gebracht wird (Davies Cde *et al.*, 2001, Grant *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigte auch unsere Mikroarray-Analyse eine Verminderung der VEGF-Expression in HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Diese Daten machen Decorin zu einem potenziellen Tumorsuppressorprotein. In der Tat ist für viele Tumorentitäten, z.B. Pankreaskarzinome, Lungentumore, Brustkrebs, Gebärmutterkrebs, orale Dysplasien und Plattenepithelkarzinome, eine Verminderung der Expression gezeigt worden, die zumeist mit

einer niedrigen Überlebensrate korrelierte (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001, McDoniels-Silvers *et al.*, 2002, Nash *et al.*, 2002, Banerjee *et al.*, 2003, Troup *et al.*, 2003, Koninger *et al.*, 2004, Newton *et al.*, 2006, Matsumine *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite führte eine Re-Expression von Decorin in mehreren Modellsystemen zu einem Wachstumsstopp der entsprechenden Tumorzellen oder gar einer Apoptose-Induktion, u.a. in den HPV18- bzw. HPV16-positiven Zervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa (Santra *et al.*, 1995, Moscatello *et al.*, 1998, Mayo *et al.*, 1999, Csordas *et al.*, 2000, Tralhao *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2005, Seidler *et al.*, 2006, Goldoni *et al.*, 2008, Pucci-Minafra *et al.*, 2008). Ein Vergleich mit den Mikroarray- und Real-Time RT-PCR-Daten aus der vorliegenden Analyse legt die Vermutung nahe, dass das Abschalten der Decorin-Expression in Zervixkarzinomzellen ein spät während des Transformationsprozesses auftretendes Ereignis ist. *DCN* stellt daher ein weiteres interessantes Kandidatengen dar, dessen verändertes Expressionsmuster möglicherweise eine differenzialdiagnostische Aussage für HPV-assoziierte Neoplasien der Zervix erlaubt.

Ein weiteres Gen, das deutlich in E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten gegenüber den Leervektor-transfizierten Primärkeratinozyten hochreguliert war, ist *WNT4*. In denselben Zellen konnte darüber hinaus auch eine leicht erhöhte Expression für Wnt3 und Wnt10a in der Mikroarray-Analyse detektiert werden. Wnt-Proteine bilden eine innerhalb der Metazoa hochkonservierte Familie, die eine essenzielle Bedeutung für die Embryonalentwicklung hat. Ihre Mitglieder nehmen Einfluss auf die Zelltypdeterminierung, die zelluläre Polarität und die Zellmigration (zur Übersicht s. Brennan und Brown, 2004). Wnt-Proteine sind sezernierte Glykoproteine, die durch Bindung an Frizzled-Rezeptoren eine Signalkaskade einleiten, die zur Transkriptionsaktivierung diverser Faktoren führt, u.a. CyclinD1, c-Myc, Wisp1, Cox-2 und Twist (Brennan und Brown, 2004). Angemerkt sei an dieser Stelle, dass in den hier analysierten HPV16 E6- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten ebenfalls eine erhöhte Expression von Twist1 festgestellt werden konnte. In humanen Tumoren sind verschiedene Komponenten des Wnt-Signalweges häufig mutiert bzw. dereguliert (zusammengefasst in Reya und Clevers, 2005). Zudem zeigen *WNT*-Gene in verschiedenen Krebszelltypen vielfach ein verändertes Expressionsverhalten (Huguet *et al.*, 1994, Iozzo *et al.*, 1995, Vider *et al.*, 1996, Bui *et al.*, 1998). Eine Amplifikation der Chromosomenregion, in der sich das *WNT4*-Gen befindet ist z.B. für Lungenkarzinompatienten gezeigt worden (Garnis *et al.*, 2005). Daneben wurde in humanen Brustkrebszelllinien eine erhöhte Expression von Wnt4 detektiert (Benhaj *et al.*, 2006). In endometrialen Karzinomen und in Basalzellkarzinomen war die Wnt4-Expression gegenüber normalen Zellen hingegen

vermindert (Bui *et al.*, 1997, Bonifas *et al.*, 2001). Inwieweit Wnt4 eine Rolle bei der HPV-vermittelten Zervixkarzinomentwicklung spielt, ist bisher allerdings noch nicht untersucht worden.

Für eine eventuelle synergistische Aktivität von HPV16 E6 und E7 in Bezug auf eine veränderte Expression zellulärer Gene spricht u.a. das Expressionsprofil von *THBS2*: Es wurde in allen drei HPV-Onkogen-exprimierenden Keratinozytenzelllinien runterreguliert, wobei die stärkste Deregulation in HPV16 E6/E7-positiven Zellen feststellbar war. Thrombospondine vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, d.h. sie sind am Auf- und Umbau von Gewebestrukturen beteiligt. Sie hemmen die Blutgefäßbildung, u.a. durch direkte Interaktion mit VEGF, Inhibierung der Aktivierung von Metalloproteinasen, Inhibierung der Endothelzellmigration sowie Apoptose-Induktion in Endothelzellen (Dawson *et al.*, 1997, Jimenez *et al.*, 2000, Wang-Rodriguez *et al.*, 2003, Short *et al.*, 2005, Greenaway *et al.*, 2007). In diversen Tumorentitäten fand man eine Runterregulierung von Thrombospondin-1 und/oder Thrombospondin-2 (Campbell *et al.*, 1998, Brown *et al.*, 1999). Umgekehrt führte eine von außen induzierte Erhöhung der Thrombospondin-1/-2-Proteinlevel in mehreren Studien zu einer Hemmung des Tumorwachstums (Streit *et al.*, 2002, Noh *et al.*, 2003, Hahn *et al.*, 2004). Für zervikale Tumore ist dagegen noch nicht spezifisch analysiert worden, inwieweit eine Verminderung der Thrombospondin-Expression stattfindet und ob diese durch die Proteine E6 und E7 hochonkogener HPV-Typen induziert wird. Daher stellt auch Thrombospondin-2 einen interessanten neuen potenziellen Marker für differenzialdiagnostische Untersuchungen zervikaler Neoplasien dar.

Ein Gen, dass sowohl in HPV16 E7- als auch E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten stärker exprimiert wurde als in Leervektor-tragenden Primärkeratinozyten, ist *WT1*. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems spielt und mit der Entstehung einer Subklasse von Nierentumoren (Wilm's Tumor) assoziiert ist (zur Übersicht s. Rauscher, 1993, Reddy und Licht, 1996). WT1 kann einen Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen und wirkt so wachstumshemmend auf eine Reihe humaner Zelltypen (Kinane *et al.*, 1995, Kudoh *et al.*, 1995, Maheswaran *et al.*, 1995, Werner *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist z.B. für akute und chronische myeloische Leukemien, Brustkrebs und Glioblastomen eine starke WT1-Expression gezeigt worden. (Nakahara *et al.*, 2004, Tuna *et al.*, 2005). Zudem wurde eine proliferationsfördernde und antiapoptotische Funktion für WT1 nachgewiesen (Maheswaran *et al.*, 1995, Guan *et al.*, 1998, Mayo *et al.*, 1999, Tuna *et al.*, 2005). Untersuchungen zur *WT1*-Expression in Zervixkarzinomzellen ergaben eine Repression dieses Gens sowohl in etablierten Zelllinien als auch im Gewebe von

betroffenen Patientinnen, die vermutlich auf eine Promotorhypermethylierung zurückzuführen ist (Carlson *et al.*, 2007, Lai *et al.*, 2008). Da in der hier beschriebenen Mikroarray-Analyse jedoch in HPV16 E6/E7-positiven humanen Keratinozyten eine gegenüber der Leervektorkontrolle erhöhte WT1-mRNA-Expression detektiert wurde, wäre es denkbar, dass die Abschaltung des WT1-Gens erst in einer späten Phase der Zervixkarzinomentwicklung auftritt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mittels Mikroarray- und quantitativer RT-PCR-Analysen diverse Gene identifiziert werden konnte, die in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten gegenüber primären Kontrollzellen differenziell exprimiert werden. Diese differenziell exprimierten Gene stellen potenzielle Marker dar, die bei einer histopathologischen Differenzierung zervikaler Neoplasien und einer Verlaufseinschätzung der Krebserkrankung hilfreich sein könnten. Ein Zusammenhang mit der Entstehung von Zervixkarzinomen wird durch Studien anderer Arbeitsgruppen z.B. für MGMT, Twist1 oder Defensin beta 1 gestützt, während eine veränderte Genexpression von RERG, LDOC1, Decorin, Thrombospondin-2 und Wnt4 in dieser Arbeit erstmalig mit HPV-assoziierten Transformationsprozessen humaner Keratinozyten in Verbindung gebracht wurde. In weitergehenden Studien muss nun überprüft werden, inwieweit eine physiologische Relevanz gegeben ist. Zum einen wurde die Mikroarray-Analyse nur einmal mit jeweils einem HPV16 E6-, E7-, bzw. E6/E7-exprimierenden Klon durchgeführt. Wiederholte Tests mit mehreren Klonen würden eine statistisch sicherere Aussage erlauben. Darüber hinaus müssen funktionelle Studien (z.B. Hemmung der E6- bzw. E7-Aktivität durch siRNAs, Reportergenanalysen etc.) zeigen, ob die veränderte Genexpression tatsächlich auf die Expression der viralen Onkoproteine zurückzuführen ist, oder ob die ermittelten Befunde eher als Sekundäreffekte anzusehen sind, die sich im Zuge des Immortalisierungsprozesses nach retroviraler Transfektion manifestiert haben („Flaschenhals-Effekt“).

5.2.3. Wnt4, RERG, Decorin, WT1 und Thrombospondin-2 stellen potenziell neue Marker für HPV-assoziierte Transformationsprozesse dar

Nachdem für diverse Gene eine differenzielle Expression in HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, wurde für einige auch die Expression auf Proteinebene mittels Western blot-Analyse überprüft. RERG- und LDOC1-spezifische Antikörper waren nicht kommerziell erwerbbar. Die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen Decorin, IFN-kappa, WT1 oder Twist1 waren

nicht in der Lage, ihr jeweiliges Antigen spezifisch oder mit ausreichend hoher Affinität zu binden. Lediglich für Wnt4 konnte eine differenzielle Expression auch auf Proteinebene verifiziert werden. Die Unterschiede im Genexpressionsverhalten zwischen Leervektor-transfizierten, HPV16 E6-, HPV16 E7- und HPV16 E6/E7-positiven Keratinozyten war allerdings weniger stark ausgeprägt als auf mRNA-Ebene: In der quantitativen Real Time RT-PCR-Analyse war eine etwa um das 5-6fache erhöhte mRNA-Expression für HPV16 E6/E7- positive Keratinozyten gegenüber HPV16 E6- bzw. HPV16 E7-positiven Keratinozyten festgestellt worden. Im Gegensatz dazu zeigte die Western blot-Analyse lediglich eine 1,5-2fach erhöhte Proteinexpression für HFK-E6/E7 verglichen mit HFK-E6, HFK-E7 bzw. HFK-LXSN. Möglicherweise griffen in den HPV16 E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, die das Wnt4-Proteinlevel herabsenkten.

Immunhistochemische Studien werden darüber hinaus in näherer Zukunft klären, ob sich auch Proteinexpressionsunterschiede für Wnt4, Decorin, LDOC1, RERG, WT1 und Thrombospondin-2 in neoplastisch verändertem Zervixgewebe im Vergleich zu normalem Zervixgewebe nachweisen lassen. Auf diese Weise soll überprüft werden, ob sich diese Proteine als differenzialdiagnostische Marker für CIN-Läsionen bzw. zervikale Tumore eignen, die eine Prognose zum Krankheitsverlauf und eine Einschätzung möglicher Therapieansätze erlauben. Hierzu wurde eine Kooperation mit Prof. C. Meijers vom Institut für Pathologie der Universität Amsterdam aufgebaut. Erste Ergebnisse werden in 1-2 Monaten erwartet.

5.3. Die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras reicht nicht aus, um in humanen Vorhautkeratinozyten einen vollständig ausgeprägten tumorigenen Phänotyp zu induzieren

Mit Hilfe von *in vitro* Modellsystemen lassen sich Ereignisse nachstellen und untersuchen, die auch *in vivo* zur Entwicklung von Tumoren führen. Für verschiedene humane Zelltypen ist auf diese Weise in der Vergangenheit gezeigt worden, dass die ektope Expression einiger weniger Onkogene ausreicht, um einen tumorigenen Phänotyp zu induzieren (vgl. Zhao *et al.*, 2004). Entscheidend dabei war, dass die eingebrachten Onkogene zentrale zelluläre Signalwege kontrollierten, so dass Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung oder

Apoptose moduliert wurden. Analog den in der Literatur beschriebenen Modellversuchen, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss von Wachstumsfaktoren wie H-Ras und c-Myc sowie PP2A-Inhibitoren wie SV40 st und CIP2A auf HPV16 E6/E7-exprimierende humane Vorhautkeratinozyten analysiert werden. Zur stabilen Expression der entsprechenden Onkogene wurden diese mittels retroviraler Transfektion in die zu untersuchenden Zellen eingeschleust. Durch Antibiotikagabe selektierte Klone wurden als Mischpopulation weiter kultiviert, um klonale Effekte zu reduzieren.

Zunächst wurden primäre humane Vorhautkeratinozyten mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der die genetische Information zur Expression von HPV16 E6/E7 trägt. Anschließend wurde eine mutierte H-Ras-Variante in die Zellen eingebracht, die konstitutiv aktiv ist (H-*ras*V12). Parallel wurden auch HPV16 E6/E7-positive humane Vorhautkeratinozyten mit dem H-*ras*V12-tragenden Vektor transfiziert, die nach Langzeitkultivierung diverse Veränderungen, u.a. chromosomale Aberrationen, akkumuliert hatten, um so eine persistierende HPV-Infektion *in vivo* zu simulieren. Die Expression und Funktionalität der eingebrachten Faktoren wurde anhand von RT-PCR- und Western blot-Analysen sowie Enzymaktivitätstests verifiziert. Da HPV16 E6 in der Lage ist, die Expression von hTERT zu induzieren, wurde im Gegensatz zu den meisten anderen *in vitro* Tumorprogressionsmodellen darauf verzichtet, auch die cDNA von hTERT einzuschleusen. Tatsächlich konnte sowohl eine erhöhte hTERT mRNA-Expression als auch eine erhöhte Telomerase-Aktivität in HPV16 E6/E7-positiven Keratinozyten gegenüber der Leervektorkontrolle und den primären Keratinozyten detektiert werden, die während längerer Passagierung in Zellkultur (Daten nicht gezeigt) bzw. nach Transfektion mit dem H-Ras-tragenden Vektor zunahmen. Zudem wurde in einem kürzlich erschienenen Artikel an humanen Zervixepithelzellen nachgewiesen, dass die HPV16 E6-vermittelte Aktivierung der Telomerase vergleichbar ist mit der, die durch ektope Expression einer hTERT-cDNA hervorgerufen wird (Narisawa-Saito *et al.*, 2008).

In H-Ras-positiven Zellen wurde darüber hinaus eine sichtlich verstärkte Expression von c-Myc festgestellt. Aufgrund dieses Befundes wurde darauf verzichtet, c-Myc zusätzlich zu H-Ras überzuexprimieren.

Lediglich die langzeitkultivierten HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven Keratinozyten waren zu einem geringen Maß fähig, Kolonien in Softagar zu bilden. Keine der untersuchten HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven humanen Keratinozytenzelllinien war jedoch in der Lage, nach subkutaner Injektion mit Matrigel innerhalb eines Beobachtungszeitraums von drei Monaten eine Tumorentwicklung in immundefizienten Nacktmäusen zu induzieren. Allerdings wurde

für die langzeitkultivierte HPV16 E6/E7- und H-Ras-positive Keratinozytenzelllinie in einem von sechs Fällen die Bildung eines 4,5 mm großen Knötchens beobachtet. Demzufolge reicht eine kombinierte Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras in den hier beschriebenen humanen Vorhautkeratinozyten nicht aus, um eine sie unter *in vitro* Bedingungen vollständig maligne zu transformieren.

Für humane Vorhautkeratinozyten, die das gesamte HPV16-Genom enthalten, wurde gezeigt, dass eine Expression der HPV16-Onkogene E6 und E7 zusammen mit H-Ras ausreicht, um einen tumorigenen Phänotyp *in vitro* zu induzieren (DiPaolo *et al.*, 1990). Allerdings waren diese Zellen vor dem Einbringen von H-ras etwa dreimal so lange in Zellkultur passagiert worden, wie die in dieser Arbeit benutzten Keratinozyten. Darüber hinaus waren durch Wachstumsfaktorentzug und Differenzierungsstimulation Populationen selektiert worden, die Wachstumsfaktor-unabhängig proliferierten und differenzierungsresistent waren. Ähnliches gilt für die von Narisawa-Saito und Kollegen an D-MEM adaptierte humane Zervixepithelzellen, für die ebenfalls nach Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras eine maligne Transformation nachgewiesen werden konnte. Demnach könnten die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und die Anwesenheit differenzierungsinduzierender Signale einen maßgeblichen Einfluss auf den Transformationsprozess humaner Epithelzellen haben, der in dem hier beschriebenen *in vitro* Modell nicht berücksichtigt wurde. Darüber hinaus könnten humane Vorhautkeratinozyten aufgrund geschlechts-, gewebe- und zelltypspezifischer Gegebenheiten eine niedrigere Empfänglichkeit bezüglich HPV16 E6/E7- und H-Ras-abhängiger transformierender Signale aufweisen als humane Zervixepithelzellen. Dafür spricht auch die statistische Häufigkeit HPV-vermittelter Krebserkrankungen der Geschlechtsorgane bei Männern und Frauen: HPV-assoziierte Peniskarzinome treten deutlich weniger häufig auf als HPV-assoziierte Zervixkarzinome (Preis and Jakse, 2007, Gesundheitsbericht des Robert-Koch-Instituts, 2008).

Interessanterweise wurde auch im von Narisawa-Saito M. *et al.* vorgestellten Tumorprogressionsmodell eine Induktion der c-Myc-Expression durch die Aktivität von H-Ras beobachtet. Dennoch transfizierten die Autoren die entsprechenden Zellen mit einem c-myc-tragenden Vektor. Obwohl die c-Myc-Proteinexpression in einem Experiment nicht von der der Parentalzelllinie zu unterscheiden war und in einem anderen bestenfalls auf das Doppelte anstieg, war im Vergleich zu den HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven Zellen eine deutliche Verkürzung der Latenzzeit bezüglich der Tumorentwicklung in subkutan injizierten Nacktmäusen zu verzeichnen. Ob eine exogene c-Myc-Expression zu einer malignen

Transformation in den hier etablierten HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven Vorhautkeratinozyten führen würde, muss in zukünftigen Studien ermittelt werden.

Somit lässt sich festhalten, dass eine zusätzliche Expression von H-Ras sowohl in kurzzeit- als auch langzeitkultivierten HPV16 E6/E7-positiven Vorhautkeratinozyten keinen vollständig ausgeprägten tumorigenen Phänotyp in diesen Zellen induziert.

5.4. Die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7, H-Ras und SV40 st resultiert in humanen Vorhautkeratinozyten in einem Überlebensnachteil

Da die hier beschriebenen humanen Vorhautkeratinozyten nach Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras offensichtlich keine tumorigenen Eigenschaften besaßen, wurde überprüft, ob die zusätzliche Inhibierung der PP2A-Aktivität durch SV40 st oder CIP2A eine maligne Transformation auslösen würde. Eine Analyse der endogenen CIP2A-Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene ergab, dass bereits primäre humane Vorhautkeratinozyten CIP2A exprimieren und dass die Expressionsstärke sich nicht wesentlich von der der immortalisierten HPV16 E6/E7- bzw. HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven Keratinozyten unterscheidet. Daher wurden keine weiteren Versuche unternommen, CIP2A in HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven Vorhautkeratinozyten überzuexprimieren.

Eine Transfektion mit einem SV40 st-kodierenden retroviralen Vektor führte entweder zur Generierung Zeocin-resistenter, HPV16 E6/E7 und H-Ras-positiver Klone oder zur Selektion SV40 st- und H-Ras-positiver Zellen, die kein HPV16 E6/E7 mehr exprimierten und infolgedessen eine erhöhte p53-Proteinexpression. Dies mag zum einen an der Technik der retroviralen Transfektion liegen, bei der eine hohe Proliferationsrate von Vorteil ist, welche allerdings bei den verwendeten humanen Vorhautkeratinozyten nicht gegeben war. Die Verschiedenartigkeit der Medien zur Kultivierung der Virusstock-produzierenden GP2-293-Zellen einerseits und der zu infizierenden Keratinozyten andererseits sowie die geringe Toleranz der Keratinozyten gegenüber Zeocin erschwerten eine erfolgreiche Transfektion zusätzlich. Da jedoch keiner der mehrfach wiederholten und nach variierendem Protokoll durchgeführten Transfektionsansätze in Klonen resultierte, die alle vier Onkogene stabil exprimierten, liegt die Vermutung nahe, dass eine kombinierte Expression insbesondere von HPV16 E6/E7 und SV40 st die Überlebensfähigkeit humaner Vorhautkeratinozyten stark

beeinträchtigt. Möglicherweise interferiert die Aktivität der verschiedenen viralen Onkogene derart miteinander, dass ein Überlebensnachteil für die Keratinozyten entsteht. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass diverse Vorhautkeratinozyten-Zelllinien generiert werden konnten, die HPV16 E6/E7, H-Ras und eine verkürzte Variante von SV40 st, die nicht mehr in der Lage ist an PP2A zu binden, stabil exprimierten. Interessanterweise wurde von Gjoerup *et al.* beschrieben, dass SV40 st in der humanen Osteosarkomzelllinie U2OS und der humanen Lungenkarzinomzelllinie H1299 Apoptose induzieren kann (Gjoerup *et al.*, 2001). Dieser Effekt war p53-unabhängig, erforderte eine intakte PP2A-Bindedomäne und konnte durch eine Bcl-2-Koexpression oder eine Behandlung mit Caspase-Inhibitoren teilweise unterdrückt werden.

Bisher wurden in der Literatur lediglich für humane Fibroblasten, embryonale Nierenepithelzellen und Pankreaszellen *in vitro* Tumorprogressionsmodelle etabliert, bei denen HPV16 E6/E7 und SV40 st parallel als tumorigenitätsinduzierende genetische Elemente verwendet wurden (Yu *et al.*, 2001, Hahn *et al.*, 2002, Campbell *et al.*, 2007). Keiner der Zelltypen stellt allerdings das natürliche Reservoir für humane Papillomviren dar. Möglicherweise verhindert die Interaktion zwischen HPV16 und zellulären Faktoren in Zellen, die natürlicherweise von humanen Papillomviren infiziert werden, eine tolerierbare Aktivität von SV40 st.

Interessanterweise verstärkte die Expression der SV40 st-Mutante z.T. die kolonienbildende Eigenschaft der HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven humanen Vorhautkeratinozyten. Eine Tumorentwicklung in immundefizienten Nacktmäusen bei subkutaner Injektion mit Matrigel konnte hingegen nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war für die humanen Vorhautkeratinozyten, die H-Ras und SV40 st, jedoch nicht mehr HPV16 E6/E7 exprimierten sowohl eine deutlich ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonieformation in Softagar, als auch das Potenzial zur Tumorbildung unter *in vivo* Bedingungen feststellbar: Bei zwei getesteten Zelllinien wurde in einem bzw. zwei von sechs Fällen eine Tumorentwicklung nach subkutaner Injektion der Zellen mit Matrigel detektiert. Zurzeit werden Versuche unternommen, die tumorigenen humanen Vorhautkeratinozyten aus den Versuchstieren zu reisolieren und in Zellkultur zu vermehren. In zukünftigen Untersuchungen sollen sowohl der Expressionsstatus der eingebrachten Onkogene überprüft als auch mögliche unter *in vivo* Bedingungen hervorgerufene Veränderungen ermittelt werden. Eine vergleichende Genexpressionsanalyse unter Verwendung von Genchips könnte z.B. Aufschluss über Genexpressionsunterschiede zwischen den tumorigenen Keratinozyten und ihren ausschließlich unter *in vitro* Bedingungen kultivierten Vorläuferzellen geben.

5.5. Die kombinierte Expression von hTERT, SV40 LT, H-Ras und SV40 st induziert in humanen Bronchialepithelzellen die Fähigkeit zur Koloniebildung in Softagar sowie zur Tumorbildung in Nacktmäusen

Neben den humanen Vorhautkeratinozyten wurden auch humane Bronchialepithelzellen dahingehend untersucht, ob eine Modulierung der p53-, Rb-, hTERT-, H-Ras- und PP2A-abhängigen zellulären Signalwege durch Einbringen definierter genetischer Elemente zu einer malignen Transformation führt. Allerdings wurden die HPV16-Onkogene E6 und E7 durch hTERT und SV40 LT ersetzt, um die Telomerase zu reaktivieren und die Funktion von p53 und Rb zu inhibieren. Zum einen sollte so eine mögliche interferierende Wirkung von HPV16 E6/E7 und SV40 st, wie sie bei den humanen Vorhautkeratinozyten aufgetreten war, vermieden werden. Zum anderen infizieren humane Papillomviren natürlicherweise selten Bronchialepithelzellen (Gerein *et al.*, 2007). Zwar gilt dies auch für SV40 (Garcea und Imperiale, 2003), da jedoch SV40 st als PP2A-inhibierendes Element verwendet werden sollte, erschien die Nutzung des Partnerproteins LT als sinnvoll.

Die retroviralen Transfektionen zur Etablierung hTERT-, SV40 LT- und H-Ras-positiver humaner Bronchialepithelzellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. B. J. Rollins (Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA) durchgeführt. Die resultierenden polyklonalen Zellen sind immortal, haben eine geringfügig ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonieformation in Softagar, sind jedoch nicht in der Lage, Tumore in immundefizienten Nacktmäusen nach subkutaner Injektion mit Matrigel zu bilden. Darüber hinaus induziert – wie schon bei den humanen Vorhautkeratinozyten beobachtet – eine konstitutiv hohe Expression von H-Ras eine starke c-Myc-Expression.

Infolge einer zusätzlichen Expression von SV40 st entwickelten diese Zellen eine deutlich verstärkte kolonienbildende Fähigkeit, die zwischen den einzelnen Zelllinien allerdings recht variabel ausgeprägt war. Darüber hinaus wurde für mindestens eine Zelllinie in einem von sechs Fällen eine Tumorentstehung in immunsupprimierten Nacktmäusen nach subkutaner Injektion mit Matrigel detektiert. Vermutlich haben nur einige Zellen der polyklonalen Population tumorigene Eigenschaften oder es haben *in vivo* weitere Veränderungen stattgefunden, die es einigen Zellen ermöglicht hat, zu einem Tumor auszuwachsen. Um zu ermitteln, worin sich die Tumorzellen möglicherweise von den nicht injizierten Ausgangszellen unterscheiden, werden im Moment weitere Versuchstiere, denen Zellen derselben Bronchialzelllinie injiziert wurden, auf eine Tumorbildung hin überprüft. Bei

reproduzierbarem Tumorwachstum sollen die entsprechenden Zellen reisoliert, in Zellkultur vermehrt und z.B. mittels Mikroarray-Analyse auf ein verändertes Genexpressionsverhalten gegenüber den ausschließlich unter *in vitro* Bedingungen kultivierten Vorläuferzellen getestet werden. Die *in vivo* Tumorigenitätsassays für zwei weitere hTERT-, H-Ras-, SV40 LT- und SV40 st-positive humane Bronchialepithelzelllinien sind noch nicht abgeschlossen. Zudem wird derzeit noch der Effekt einer immunsupprimierenden Ganzkörperbestrahlung der Versuchstiere vor der Injektion untersucht.

Die Expression einer verkürzten, nicht mehr an PP2A bindenden SV40 st-Variante in SV40 LT-, hTERT- und H-Ras-positiven humanen Bronchialepithelzellen führte ebenfalls zu einer sichtlich erhöhten Koloniebildung in Softagar, die z.T. ähnlich stark ausgeprägt war wie die der SV40 st-Wildtyp exprimierenden Zellen. Dennoch waren die Bronchialepithelzellen, die die verkürzte SV40 st-Variante exprimierten, nicht in der Lage, nach subkutaner Injektion zusammen mit Matrigel zu Tumoren in Nacktmäusen auszuwachsen. Demnach ist eine Interaktion zwischen SV40 st und PP2A nötig, um ein Tumorwachstum *in vivo* zu induzieren.

5.6. CIP2A, ein zellulärer Inhibitor der Proteinphosphatase 2A, wird in immortalisierten und tumorigenen humanen Bronchialepithelzellen im Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelzellen differenziell exprimiert

In vielen *in vitro* Tumorprogressionsmodellen wurde das SV40 small t Antigen als eines der genetischen Elemente eingesetzt, um humane Zellen maligne zu transformieren. Der Einfluss von SV40 st erstreckt sich auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellzyklusprogression, Apoptose, Zellbeweglichkeit und Zelladhäsion (zusammengefasst in Sablina und Hahn, 2008). Das transformierende Potenzial von SV40 st beruht entscheidend auf der Interaktion mit der Proteinphosphatase 2A und der daraus resultierenden Inhibierung dieses Enzyms. Um sich mehr der *in vivo* Situation anzunähern, wurde vielfach versucht, SV40 st durch endogene Faktoren auszutauschen. Beispielsweise konnten die Depletion der PP2A-Untereinheit B56 γ , die ektope Expression einer konstitutiv aktiven c-Myc-Variante (c-MycT58A), die ektope Expression eines aktivierten PI3K-Allels oder die kombinierte Expression der aktivierten PI3K-Effektoren Akt und Rac1 die transformierende Eigenschaft von SV40 st in diversen *in vitro* Modellen ersetzen (zusammengefasst in Sablina und Hahn,

2008). Kürzlich ist CIP2A (*cancerous inhibitor of PP2A*) als ein endogener PP2A-Inhibitor identifiziert worden, der ebenfalls in der Lage ist, die transformierende Wirkung von SV40 st in humanen embryonalen Nierenepithelzellen zu substituieren, indem es eine PP2A-abhängige Dephosphorylierung von c-Myc an Serin62 und somit einen proteolytischen Abbau von c-Myc verhindert (Junttila *et al.*, 2007). Eine Depletion von CIP2A in HeLa-Zellen führte zu einem reduzierten Wachstum sowohl unter *in vitro* als auch *in vivo* Bedingungen. Eine erhöhte CIP2A-Expression gegenüber Normalgewebe ist bisher für Kopf-und-Hals-Tumore sowie Kolon- und Magenkarzinome gezeigt worden (Junttila *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2008).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Befunde stellte sich die Frage, ob CIP2A die transformierende Funktion von SV40 st in den hier etablierten *in vitro* Tumorprogressionsmodellen ersetzen könnte. Eine Überprüfung der CIP2A-mRNA- und Proteinexpression mittels RT-PCR- bzw. Western blot-Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen primären Vorhautkeratinozyten und den in dieser Arbeit generierten immortalisierten bzw. tumorigenen humanen Vorhautkeratinozyten-Zelllinien. Auch normale dermale Fibroblasten und ektozervikale Keratinozyten wiesen eine deutliche CIP2A-Expression auf (Daten nicht gezeigt). Dies ist insofern überraschend, als dass eine starke CIP2A-Expression bisher ausschließlich im Zusammenhang mit einem tumorigenen Phänotyp beschrieben wurde. Die Funktion von CIP2A in normalen humanen Zellen muss in künftigen Studien genauer charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu den humanen Vorhautkeratinozyten wurde für die immortalisierten hTERT-, SV40LT- bzw. H-Ras-positiven und die tumorigenen hTERT-, SV40 LT-, SV40 st- und H-Ras-positiven humanen Bronchialepithelzellen eine gegenüber normalen humanen Bronchialepithelzellen verstärkte Proteinexpression in der Western blot-Analyse nachgewiesen. Auch die Lungenkarzinomzelllinie A549 zeigte eine Erhöhung der CIP2A-Proteinexpression. Eine immunhistochemische Untersuchung von A549-Zellen bestätigte eine verstärkte CIP2A-Proteinexpression im Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelzellen. Erste Ergebnisse einer immunhistochemischen Analyse von Lungenkarzinomen deuten darüber hinaus auf eine gegenüber Normalgewebe verstärkte CIP2A-Expression sowohl in Plattenepithelzellkarzinomen als auch Adenokarzinomen der Lunge hin. Demnach eignet sich CIP2A zwar nicht als PP2A-inhibierender endogener Ersatz für SV40 in den hier beschriebenen *in vitro* Tumorprogressionsmodellen; es könnte jedoch einen neuen Progressionsmarker für Lungentumore darstellen. Um dies zu klären, werden derzeit weitere Lungenkarzinome immunhistochemisch bzgl. ihrer CIP2A-Expression analysiert.

5.7. Bewertung von *in vitro* Modellen zur Etablierung maligne transformierter humaner Zellen

Die maligne Transformation normaler humaner Zellen wird als ein schrittweiser Prozess betrachtet, der die Überwindung proliferationshemmender Barrieren, die Ausschaltung Apoptose-induzierender Mechanismen, die Umgehung oder Inaktivierung der körpereigenen Immunabwehr und die Neuorganisation von Gewebestrukturen umfasst (zur Übersicht s. Nowell, 2002, Vogelstein und Kinzler, 2004). Obwohl genomische Instabilität ein grundlegendes Charakteristikum von Tumorzellen ist, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass die Modulation weniger zentraler Regulatoren in einer Zelle ausreicht, um einen tumorigenen Phänotyp zu induzieren (zusammengefasst in Hanahan und Weinberg, 2000, Hahn und Weinberg, 2002). Daher wurden in der Vergangenheit Strategien entwickelt, um die minimale Anzahl an deregulierten Faktoren zu ermitteln, die für eine maligne Transformation verantwortlich sind. Unter *in vitro* Bedingungen kultivierte Zellen, in die diverse zelluläre und/oder virale Onkogene verschiedenster Kombination eingebracht werden können, stellen ein interessantes Modellsystem dar, um entsprechende Untersuchungen durchzuführen. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde in diversen Studien gezeigt, dass die Inhibierung von p53 (z.B. durch SV40 LT, HPV16 E6 oder eine dominant-negative p53-Variante) und Rb (z.B. durch SV40 LT, HPV16 E7 oder aktivierte CDK4 + Cyclin D), die Induktion der Telomerase (z.B. durch hTERT oder HPV16 E6), die konstitutive Aktivität von Ras und die Inaktivierung der Proteinphosphatase 2A (z.B. durch SV40 st oder Suppression von PP2A B56 γ) oder downstream von PP2A liegender Signalmoleküle (z.B. durch aktivierte PI3K oder aktivierte Akt + Rac1) ausreichen, um z.B. Fibroblasten, Nierenepithelzellen, Brustepithelzellen, orale Keratinozyten u.a. normale humane Zellen maligne zu transformieren (zusammengefasst in Zhao *et al.*, 2004, Heeg *et al.*, 2006, Sablina und Hahn, 2008).

Aktuelle Studien und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen allerdings deutlich, dass sich dieses Konzept nicht verallgemeinern lässt. Beispielsweise wurde von Agaki *et al.* beschrieben, dass sich nur in zwei von vier humanen diploiden Fibroblastenzelllinien durch die kombinierte Expression von SV40 LT + st, onkogenem H-Ras und hTERT ein tumorigener Phänotyp induzieren ließ (Akagi *et al.*, 2003). Die Autoren schließen daraus, dass der genetische Hintergrund und der Gewebeer sprung entscheidend dazu beitragen, durch welche genetischen Elemente humane Zellen maligne transformiert werden können. Dies trifft vermutlich auch auf humane Vorhautkeratinozyten und humane Zervixepithelzellen zu, die

offensichtlich unterschiedlich auf HPV16 E6/E7- und H-Ras-vermittelte Signale reagieren: Während eine Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras eine maligne Transformation in humanen Zervixepithelzellen auslöste (Narisawa-Saito *et al.*, 2008), wurde durch dieselbe Onkogenkombination in den hier beschriebenen humanen Vorhautkeratinozyten kein vollständiger tumorigener Phänotyp induziert. (vgl. Abschnitt 5.3).

Ein wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit der malignen Transformation humaner Zellen ist die Signalgebung durch die Umwelt, d.h. *in vivo* durch benachbarte Zellen bzw. *in vitro* durch die vorgegebene Zusammensetzung des Mediums. Wie bereits unter Abschnitt 5.2 diskutiert, können Wachstumsfaktorentzug und differenzierungsstimulierende Signale *in vitro* zur Selektion von Populationen führen, die empfänglicher gegenüber Onkogen-vermittelten Transformationsprozessen sind. Unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen stattfindende Selektionsprozesse sind darüber hinaus z.B. für humane Fibroblasten beschrieben worden, die hTERT, aktivierte CDK4, dominant-negatives p53 und onkogenes Ras exprimierten (Mahale *et al.*, 2008). Auch humane Fibroblasten, die p16^{Ink4a}-defizient waren und hTERT, H-Ras und c-Myc ektop exprimierten, wuchsen ähnlich den in dieser Arbeit beschriebenen humanen Vorhautkeratinozyten und humanen Bronchialepithelzellen nur vereinzelt zu Tumoren in immundefizienten Nacktmäusen aus (Drayton *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen ergaben, dass *in vivo* eine Selektion maligner Klone stattgefunden hatte. Zukünftige Studien müssen daher klären, ob die in der Literatur beschriebenen genetischen Elemente, die zur Induktion einer malignen Transformation in humane Zellen eingebracht werden, ausschließlich für den tumorigenen Phänotyp verantwortlich sind, oder ob sie eventuell die Empfindlichkeit gegenüber anderen transformierenden Signalen erhöhen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Infektion des Genitaltrakts mit hochonkogenen Papillomvirustypen ist ein relativ häufiges Ereignis in der menschlichen Population. Dennoch erkrankt nur ein Bruchteil der infizierten Frauen an Gebärmutterhalskrebs. Dies legt nahe, dass neben den viralen Onkoproteinen E6 und E7 auch zelluläre Faktoren an der Entwicklung von zervikalen Tumoren beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Identifizierung zellulärer Gene, die infolge der Expression der viralen Onkoproteine E6 und/oder E7 des humanen Papillomvirustyps 16 unter Langzeitkultivierungsbedingungen in humanen Keratinozyten ein verändertes Genexpressionsprofil aufweisen. Es konnten mittels Mikroarray-Analyse insgesamt 3434 zelluläre Gene ermittelt werden, die in HPV16 E6-, E7- bzw. E6/E7-positiven humanen Vorhautkeratinozyten gegenüber primären Kontrollzellen differenziell exprimiert waren. Hierzu zählen insbesondere Gene, deren Produkte an der zellulären Differenzierung, der Zellzyklusprogression, der Apoptose und der Immunantwort beteiligt sind. Das veränderte Genexpressionsmuster von 14 Genen, darunter *DCN*, *LDOC1*, *REGG*, *THBS2*, *TWIST1*, *WT1* und *WNT4* konnte mit Hilfe einer Real Time RT-PCR-Analyse verifiziert werden. Zudem konnte auch auf Proteinebene eine erhöhte Wnt4-Expression in HPV16 E6/E7-positiven Keratinozyten im Vergleich zu primären Kontrollzellen und HPV16 E6- bzw. E7-positiven Zellen in einer Western blot-Analyse nachgewiesen werden. Demnächst soll die Expression von *DCN*, *REGG*, *THBS2*, *WT1* und *WNT4* immunhistochemisch an CIN-Läsionen im Vergleich zu normalem Zervixgewebe untersucht werden, um die Eignung dieser Gene als prognostische Marker für Zervixkarzinome zu überprüfen. Eine Inhibierung der HPV16 E6- bzw. E7-Aktivität in den HPV16 E6-, E7- und E6/E7-positiven Keratinozyten mit Hilfe von siRNAs soll zudem in künftigen Studien Aufschluss darüber geben, ob die differenzielle Expression verschiedener Gene spezifisch von der Aktivität der viralen Onkoproteine abhängt. Funktionelle Studien wie z.B. Reporteranalysen sollen darüber hinaus zur weiteren Aufklärung der mechanistischen Hintergründe der durch HPV16 E6 bzw. E7 induzierten Genexpressionsveränderungen beitragen.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Etablierung eines *in vitro* Tumorprogressionsmodells sowohl für humane Vorhautkeratinozyten als auch humane Bronchialepithelzellen, um zu ermitteln, ob die gezielte Modulation p53-, Rb-, Telomerase-, Wachstumsfaktor- und PP2A-abhängiger Signalwege ausreicht, um in diesen Zelltypen eine maligne Transformation zu

induzieren. Hierzu wurden verschiedene virale und zelluläre Onkogene mittels retroviraler Transfektion in die Zellen eingebracht. Für humane Vorhautkeratinozyten konnte gezeigt werden, dass die Expression der HPV16-Onkoproteine E6 und E7 eine verstärkte hTERT-mRNA-Expression bzw. Telomerase-Aktivität induziert. Diese Zellen besitzen jedoch auch nach Langzeitkultivierung keine tumorigenen Eigenschaften. Die kombinierte Expression von HPV16 E6/E7 und H-Ras und eine damit verbundene Erhöhung der c-Myc-Proteinexpression führt zwar zu einer verstärkten Kolonieformation in Softagar, befähigt diese Zellen nach subkutaner Injektion jedoch nicht zur Tumorbildung in immundefizienten Nacktmäusen. Eine zusätzliche Expression von SV40 st resultiert in HPV16 E6/E7- und H-Ras-positiven humanen Vorhautkeratinozyten in einem Wachstumsnachteil, dem die Zellen mit einem Abschalten der HPV16 E6/E7- oder SV40 st-Expression entgegenwirken. Keratinozyten, die nachweislich HPV16 E6/E7-negativ, aber H-Ras- und SV40 st-positiv waren, wiesen ein deutlich erhöhtes kolonienbildendes Potenzial auf. Für zwei Zelllinien konnte darüber hinaus in einem bzw. zwei von sechs Fällen eine Tumorentwicklung in immundefizienten Nacktmäusen nach subkutaner Injektion mit Matrigel detektiert werden. Für humane Bronchialepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Expression von hTERT, SV40 LT und H-Ras eine mäßig ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonieformation in Softagar induziert, welche durch eine zusätzliche Expression von SV40 st sichtlich gesteigert wird. Während hTERT-, SV40 LT- und H-Ras-positive Zellen keine Tumorentwicklung *in vivo* induzieren, konnte bisher für mindestens eine hTERT-, SV40 LT-, H-Ras- und SV40 st-positive humane Bronchialepithelzelllinie das Potenzial zur Tumorbildung in immundefizienten Nacktmäusen infolge einer subkutanen Injektion mit Matrigel in einem von sechs Fällen dokumentiert werden. Der *in vivo* Tumorigenitätstest für zwei weitere Zelllinien ist noch nicht abgeschlossen. Zurzeit werden in Nacktmäusen zu Tumoren ausgewachsene humane Zellen reisoliert. Weitergehende Genexpressionsanalysen sollen in Zukunft Aufschluss darüber geben, welche Veränderungen diese tumorigenen Zellen *in vivo* durchlaufen haben.

Im Zusammenhang mit der Etablierung der beschriebenen *in vitro* Tumorprogressionsmodelle konnte zudem nachgewiesen werden, dass CIP2A nicht als PP2A-inhibierendes Element anstelle von SV40 st verwendet werden kann, da bereits immortalisierte Vorhautkeratinozyten und Bronchialepithelzellen eine deutliche CIP2A-mRNA- und Proteinexpression aufweisen. Allerdings konnte eine erhöhte CIP2A-Proteinexpression in immortalisierten und tumorigenen humanen Bronchial- bzw. Lungenepithelzellen detektiert werden. Erste immunhistochemische Analysen der CIP2A-Expression an Lungengewebe deuten auf eine

mögliche Eignung von CIP2A als prognostischen Marker für Lungenkarzinome hin. Die immunhistochemische Untersuchung der CIP2A-Expression wird demnächst an einer statistisch repräsentativen Anzahl von Lungentumoren fortgeführt. In zukünftigen Studien soll die CIP2A-Expression in immortalisierten und tumorigenen Bronchialepithelzellen mittels siRNAs abgeschaltet bzw. in normalen Bronchialepithelzellen verstärkt werden, um so den Einfluss von CIP2A auf den transformierten Phänotyp analysieren zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Lemarroy, A., Gariglio, P., Whitaker, N.J., Eichhorst, S.T., zur Hausen, H., Krammer, P.H. and Rosl, F. (2002):** Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. **21**: 165-75.
- Akagi, T., Sasai, K. and Hanafusa, H. (2003):** Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 13567-72.
- Arroyo, J.D. and Hahn, W.C. (2005):** Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene*. **24**: 7746-55.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., et al., eds. (1997):** *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley
- Babu, A. und Verma, R. S. (1989):** Human Chromosomes: *Manual of Basic Techniques*. Pergamon Press
- Bailey, S.M., Brenneman, M.A. and Goodwin, E.H. (2004):** Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res*. **32**: 3743-51.
- Banerjee, A.G., Bhattacharyya, I., Lydiatt, W.M. and Vishwanatha, J.K. (2003):** Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. **63**: 7769-76.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003):** Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J*. **22**: 4212-22.
- Bechter, O.E., Zou, Y., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2003):** Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep*. **4**: 1138-43.
- Benhaj, K., Akcali, K.C. and Ozturk, M. (2006):** Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep*. **15**: 701-7.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998):** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**: 349-52.

- Boehm, J.S., Hession, M.T., Bulmer, S.E. and Hahn, W.C. (2005):** Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol.* **25**: 6464-74.
- Boehm, J.S., Zhao, J.J., Yao, J., Kim, S.Y., Firestein, R., Dunn, I.F., Sjostrom, S.K., Garraway, L.A., Weremowicz, S., Richardson, A.L., Greulich, H., Stewart, C.J., Mulvey, L.A., Shen, R.R., Ambrogio, L., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E., Vidal, M., Meyerson, M., Grenier, J.K., Hinkle, G., Root, D.E., Roberts, T.M., Lander, E.S., Polyak, K. and Hahn, W.C. (2007):** Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell.* **129**: 1065-79.
- Bond, J.A., Wyllie, F.S. and Wynford-Thomas, D. (1994):** Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene.* **9**: 1885-9.
- Bonifas, J.M., Pennypacker, S., Chuang, P.T., McMahon, A.P., Williams, M., Rosenthal, A., De Sauvage, F.J. and Epstein, E.H., Jr. (2001):** Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol.* **116**: 739-42.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.M., Storey, A. and Banks, L. (1994):** The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology.* **203**: 73-80.
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandan, E., Cabello-Verrugio, C. and Vial, C. (2008):** Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. *Matrix Biol.* **27**: 700-8.
- Brennan, K.R. and Brown, A.M. (2004):** Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **9**: 119-31.
- Brown, L.F., Guidi, A.J., Schnitt, S.J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M.L., Yeo, T.K., Tognazzi, K. and Dvorak, H.F. (1999):** Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res.* **5**: 1041-56.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. and Reddel, R.R. (1995):** Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J.* **14**: 4240-8.
- Bui, T.D., O'Brien, T., Crew, J., Cranston, D. and Harris, A.L. (1998):** High expression of Wnt7b in human superficial bladder cancer vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer.* **77**: 319-24.

- Bui, T.D., Zhang, L., Rees, M.C., Bicknell, R. and Harris, A.L. (1997):** Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br J Cancer*. **75**: 1131-6.
- Cabello-Verrugio, C. and Brandan, E. (2007):** A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1. *J Biol Chem*. **282**: 18842-50.
- Campbell, P.M., Groehler, A.L., Lee, K.M., Ouellette, M.M., Khazak, V. and Der, C.J. (2007):** K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Res*. **67**: 2098-106.
- Campbell, S.C., Volpert, O.V., Ivanovich, M. and Bouck, N.P. (1998):** Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res*. **58**: 1298-304.
- Carlson, J.W., Nucci, M.R., Brodsky, J., Crum, C.P. and Hirsch, M.S. (2007):** Biomarker-assisted diagnosis of ovarian, cervical and pulmonary small cell carcinomas: the role of TTF-1, WT-1 and HPV analysis. *Histopathology*. **51**: 305-12.
- Chen, W., Arroyo, J.D., Timmons, J.C., Possemato, R. and Hahn, W.C. (2005):** Cancer-associated PP2A Aalpha subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity. *Cancer Res*. **65**: 8183-92.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K.T., Plattner, C.A., Pallas, D.C. and Hahn, W.C. (2004):** Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*. **5**: 127-36.
- Cichowski, K. and Jacks, T. (2001):** NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. **104**: 593-604.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002):** The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. **2**: 910-7.
- Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J. and Reddel, R.R. (2007):** Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. **315**: 1850-3.
- Counter, C.M., Gupta, J., Harley, C.B., Leber, B. and Bacchetti, S. (1995):** Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*. **85**: 2315-20.
- Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Capelli, P., Blaveri, E., Baron, A., Terris, B., Jones, M., Tyson, K., Bassi, C., Scarpa, A. and Lemoine, N.R. (2001):** Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene*. **20**: 7437-46.

- Csordas, G., Santra, M., Reed, C.C., Eichstetter, I., McQuillan, D.J., Gross, D., Nugent, M.A., Hajnoczky, G. and Iozzo, R.V. (2000):** Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem.* **275**: 32879-87.
- Davies Cde, L., Melder, R.J., Munn, L.L., Mouta-Carreira, C., Jain, R.K. and Boucher, Y. (2001):** Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc Res.* **62**: 26-42.
- Dawson, D.W., Pearce, S.F., Zhong, R., Silverstein, R.L., Frazier, W.A. and Bouck, N.P. (1997):** CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* **138**: 707-17.
- de Lange, T. (2002):** Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* **21**: 532-40.
- Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P. and Rheinwald, J.G. (2000):** Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol.* **20**: 1436-47.
- DiPaolo, J.A., Woodworth, C.D., Popescu, N.C., Koval, D.L., Lopez, J.V. and Doniger, J. (1990):** HSV-2-induced tumorigenicity in HPV16-immortalized human genital keratinocytes. *Virology.* **177**: 777-9.
- Downward, J. (2003):** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **3**: 11-22.
- Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M. and Peters, G. (2003):** Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell.* **4**: 301-10.
- Duffy, C.L., Phillips, S.L. and Klingelhutz, A.J. (2003):** Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology.* **314**: 196-205.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. and Reddel, R.R. (2000):** Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* **26**: 447-50.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2001):** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* **61**: 3225-9.
- Finlin, B.S., Gau, C.L., Murphy, G.A., Shao, H., Kimel, T., Seitz, R.S., Chiu, Y.F., Botstein, D., Brown, P.O., Der, C.J., Tamanoi, F., Andres, D.A. and Perou, C.M.**

- (2001): RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem.* **276**: 42259-67.
- Foster, S.A., Wong, D.J., Barrett, M.T. and Galloway, D.A. (1998):** Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol.* **18**: 1793-801.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P. (1986):** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* **323**: 643-6.
- Garcea, R.L. and Imperiale, M.J. (2003):** Simian virus 40 infection of humans. *J Virol.* **77**: 5039-45.
- Garnis, C., Campbell, J., Davies, J.J., Macaulay, C., Lam, S. and Lam, W.L. (2005):** Involvement of multiple developmental genes on chromosome 1p in lung tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* **14**: 475-82.
- Gerein, V., Schmandt, S., Babkina, N., Barysik, N., Coerdts, W. and Pfister, H. (2007):** Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation. *Cancer Detect Prev.* **31**: 276-81.
- Gjoerup, O., Zaveri, D. and Roberts, T.M. (2001):** Induction of p53-independent apoptosis by simian virus 40 small t antigen. *J Virol.* **75**: 9142-55.
- Goldoni, S., Seidler, D.G., Heath, J., Fassan, M., Baffa, R., Thakur, M.L., Owens, R.T., McQuillan, D.J. and Iozzo, R.V. (2008):** An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol.* **173**: 844-55.
- Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F.J. and Jordan, J. (2004):** p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem.* **60**: 287-307.
- Grant, D.S., Yenisey, C., Rose, R.W., Tootell, M., Santra, M. and Iozzo, R.V. (2002):** Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene.* **21**: 4765-77.
- Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., Lamarre, J. and Petrik, J. (2007):** Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol.* **210**: 807-18.
- Guan, L.S., Rauchman, M. and Wang, Z.Y. (1998):** Induction of Rb-associated protein (RbAp46) by Wilms' tumor suppressor WT1 mediates growth inhibition. *J Biol Chem.* **273**: 27047-50.

- Hahn, W., Ho, S.H., Jeong, J.G., Hahn, E.Y., Kim, S., Yu, S.S., Kim, S. and Kim, J.M. (2004):** Viral vector-mediated transduction of a modified thrombospondin-2 cDNA inhibits tumor growth and angiogenesis. *Gene Ther.* **11**: 739-45.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999):** Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature.* **400**: 464-8.
- Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A. and Weinberg, R.A. (2002):** Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol.* **22**: 2111-23.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002):** Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* **347**: 1593-603.
- Halbert, C.L., Demers, G.W. and Galloway, D.A. (1991):** The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.* **65**: 473-8.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000):** The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**: 57-70.
- Hara, E., Tsurui, H., Shinozaki, A., Nakada, S. and Oda, K. (1991):** Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**: 528-34.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990):** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* **345**: 458-60.
- Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B. and Robinson, M.O. (1997):** Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* **11**: 3109-15.
- Harris, C.P., Lu, X.Y., Narayan, G., Singh, B., Murty, V.V. and Rao, P.H. (2003):** Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* **36**: 233-41.
- Heeg, S., Doebele, M., von Werder, A. and Opitz, O.G. (2006):** In vitro transformation models: modeling human cancer. *Cell Cycle.* **5**: 630-4.
- Huguet, E.L., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Bicknell, R. and Harris, A.L. (1994):** Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* **54**: 2615-21.
- Hunter, T. and Pines, J. (1994):** Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* **79**: 573-82.

- Iozzo, R.V., Eichstetter, I. and Danielson, K.G. (1995):** Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res.* **55**: 3495-9.
- Jimenez, B., Volpert, O.V., Crawford, S.E., Febbraio, M., Silverstein, R.L. and Bouck, N. (2000):** Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* **6**: 41-8.
- Johnson, D.G. and Schneider-Broussard, R. (1998):** Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci.* **3**: d447-8.
- Junttila, M.R., Puustinen, P., Niemela, M., Ahola, R., Arnold, H., Bottzauw, T., Ala-aho, R., Nielsen, C., Ivaska, J., Taya, Y., Lu, S.L., Lin, S., Chan, E.K., Wang, X.J., Grenman, R., Kast, J., Kallunki, T., Sears, R., Kahari, V.M. and Westermarck, J. (2007):** CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell.* **130**: 51-62.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998):** Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 8292-7.
- Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A. and Iozzo, R.V. (2000):** Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem.* **275**: 21801-4.
- Kelly, L.M. and Gilliland, D.G. (2002):** Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **3**: 179-98.
- Kim, S.H., Nakagawa, H., Navaraj, A., Naomoto, Y., Klein-Szanto, A.J., Rustgi, A.K. and El-Deiry, W.S. (2006):** Tumorigenic conversion of primary human esophageal epithelial cells using oncogene combinations in the absence of exogenous Ras. *Cancer Res.* **66**: 10415-24.
- Kinane, T.B., Finder, J.D., Kawashima, A., Brown, D., Abbate, M., Fredericks, W.J., Sukhatme, V.P., Rauscher, F.J., 3rd and Ercolani, L. (1995):** LLC-PK1 cell growth is repressed by WT1 inhibition of G-protein alpha i-2 protooncogene transcription. *J Biol Chem.* **270**: 30760-4.
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P. and Auvinen, E. (2008):** Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene.* **27**: 2532-41.
- Knudson, A.G., Jr. (1971):** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **68**: 820-3.
- Knudson, A.G., Jr. (1986):** Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet.* **20**: 231-51.

- Koninger, J., Giese, T., di Mola, F.F., Wenthe, M.N., Esposito, I., Bachem, M.G., Giese, N.A., Buchler, M.W. and Friess, H. (2004):** Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* **322**: 943-9.
- Koutsky, L.A. and Harper, D.M. (2006):** Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine.* **24 Suppl 3**: S114-21.
- Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.** 6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008. *Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.).*
- Kudoh, T., Ishidate, T., Moriyama, M., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1995):** G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 4517-21.
- Lai, H.C., Lin, Y.W., Huang, T.H., Yan, P., Huang, R.L., Wang, H.C., Liu, J., Chan, M.W., Chu, T.Y., Sun, C.A., Chang, C.C. and Yu, M.H. (2008):** Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer.* **123**: 161-7.
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C.L. and Khavari, P.A. (2002):** CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med.* **8**: 1105-14.
- Li, W., Ge, Z., Liu, C., Liu, Z., Bjorkholm, M., Jia, J. and Xu, D. (2008):** CIP2A is overexpressed in gastric cancer and its depletion leads to impaired clonogenicity, senescence, or differentiation of tumor cells. *Clin Cancer Res.* **14**: 3722-8.
- Liu, H., Dibling, B., Spike, B., Dirlam, A. and Macleod, K. (2004a):** New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev.* **14**: 55-64.
- Liu, J., Yang, G., Thompson-Lanza, J.A., Glassman, A., Hayes, K., Patterson, A., Marquez, R.T., Auersperg, N., Yu, Y., Hahn, W.C., Mills, G.B. and Bast, R.C., Jr. (2004b):** A genetically defined model for human ovarian cancer. *Cancer Res.* **64**: 1655-63.
- Loercher, A.E., Tank, E.M., Delston, R.B. and Harbour, J.W. (2005):** MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol.* **168**: 35-40.
- Mahale, A.M., Khan, Z.A., Igarashi, M., Nanjangud, G.J., Qiao, R.F., Yao, S., Lee, S.W. and Aaronson, S.A. (2008):** Clonal selection in malignant transformation of human fibroblasts transduced with defined cellular oncogenes. *Cancer Res.* **68**: 1417-26.

- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G. and Haber, D.A. (1995):** The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* **9**: 2143-56.
- Mammas, I.N., Zafiropoulos, A. and Spandidos, D.A. (2005):** Involvement of the ras genes in female genital tract cancer. *Int J Oncol.* **26**: 1241-55.
- Matsumine, A., Shintani, K., Kusuzaki, K., Matsubara, T., Satonaka, H., Wakabayashi, T., Iino, T. and Uchida, A. (2007):** Expression of decorin, a small leucine-rich proteoglycan, as a prognostic factor in soft tissue tumors. *J Surg Oncol.* **96**: 411-8.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Drouin, S.S., Madrid, L.V., Marshall, A.F., Reed, J.C., Weissman, B.E. and Baldwin, A.S. (1999):** WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Embo J.* **18**: 3990-4003.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M. and Franklin, R.A. (2007):** Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* **1773**: 1263-84.
- McDoniels-Silvers, A.L., Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A. and You, M. (2002):** Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* **8**: 1127-38.
- McGhee, E.M., Cotter, P.D., Weier, J.F., Berline, J.W., Turner, M.A., Gormley, M. and Palefsky, J.M. (2006):** Molecular cytogenetic characterization of human papillomavirus16-transformed foreskin keratinocyte cell line 16-MT. *Cancer Genet Cytogenet.* **168**: 36-43.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. and Weinberg, R.A. (1997):** hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* **90**: 785-95.
- Mitsuuchi, Y. and Testa, J.R. (2002):** Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet.* **115**: 183-8.
- Mizumoto, Y., Kyo, S., Ohno, S., Hashimoto, M., Nakamura, M., Maida, Y., Sakaguchi, J., Takakura, M., Inoue, M. and Kiyono, T. (2006):** Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene.* **25**: 5673-82.

- Moreno, C.S., Ramachandran, S., Ashby, D.G., Laycock, N., Plattner, C.A., Chen, W., Hahn, W.C. and Pallas, D.C. (2004):** Signaling and transcriptional changes critical for transformation of human cells by simian virus 40 small tumor antigen or protein phosphatase 2A B56gamma knockdown. *Cancer Res.* **64**: 6978-88.
- Moscatello, D.K., Santra, M., Mann, D.M., McQuillan, D.J., Wong, A.J. and Iozzo, R.V. (1998):** Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* **101**: 406-12.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M. and Zacny, V.L. (2001):** Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* **20**: 7888-98.
- Nagasaki, K., Schem, C., von Kaisenberg, C., Biallek, M., Rosel, F., Jonat, W. and Maass, N. (2003):** Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis. *Int J Cancer.* **105**: 454-8.
- Nakahara, Y., Okamoto, H., Mineta, T. and Tabuchi, K. (2004):** Expression of the Wilms' tumor gene product WT1 in glioblastomas and medulloblastomas. *Brain Tumor Pathol.* **21**: 113-6.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. and Cech, T.R. (1997):** Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* **277**: 955-9.
- Narisawa-Saito, M., Yoshimatsu, Y., Ohno, S., Yugawa, T., Egawa, N., Fujita, M., Hirohashi, S. and Kiyono, T. (2008):** An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res.* **68**: 5699-705.
- Nash, M.A., Deavers, M.T. and Freedman, R.S. (2002):** The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* **8**: 1754-60.
- Nees, M., Geoghegan, J.M., Hyman, T., Frank, S., Miller, L. and Woodworth, C.D. (2001):** Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* **75**: 4283-96.
- Newton, T.R., Parsons, P.G., Lincoln, D.J., Cummings, M.C., Wyld, D.K., Webb, P.M., Green, A.C. and Boyle, G.M. (2006):** Expression profiling correlates with treatment

- response in women with advanced serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. **119**: 875-83.
- Noh, Y.H., Matsuda, K., Hong, Y.K., Kunstfeld, R., Riccardi, L., Koch, M., Oura, H., Dadras, S.S., Streit, M. and Detmar, M. (2003):** An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*. **121**: 1536-43.
- Nolte, C.M. (2004):** Etablierung und Charakterisierung einer humanen Zelllinie mit stabil integriertem E2Ad12/Reporterkonstrukt zum Studium der Regulation des E2-Promotors durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen
- Nowell, P.C. (2002):** Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol*. **12**: 261-6.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D. and Jacks, T. (2004):** Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. **119**: 847-60.
- Oxford, G. and Theodorescu, D. (2003):** The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol*. **170**: 1987-93.
- Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L. and Roberts, T.M. (1990):** Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*. **60**: 167-76.
- Pim, D., Collins, M. and Banks, L. (1992):** Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. **7**: 27-32.
- Preis, E. and Jakse, G. (2007):** [Options in palliative therapy for penile cancer]. *Urologe A*. **46**: 49-53.
- Pucci-Minafra, I., Cancemi, P., Di Cara, G., Minafra, L., Feo, S., Forlino, A., Tira, M.E., Tenni, R., Martini, D., Ruggeri, A. and Minafra, S. (2008):** Decorin transfection induces proteomic and phenotypic modulation in breast cancer cells 8701-BC. *Connect Tissue Res*. **49**: 30-41.
- Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001):** Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*. **15**: 398-403.

- Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A. and Weinberg, R.A. (2004):** Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*. **6**: 171-83.
- Rauscher, F.J., 3rd (1993):** The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *Faseb J*. **7**: 896-903.
- Reddel, R.R., Bryan, T.M. and Murnane, J.P. (1997):** Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry (Mosc)*. **62**: 1254-62.
- Reddy, J.C. and Licht, J.D. (1996):** The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta*. **1287**: 1-28.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005):** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. **434**: 843-50.
- Reznikoff, C.A., Belair, C., Savelieva, E., Zhai, Y., Pfeifer, K., Yeager, T., Thompson, K.J., DeVries, S., Bindley, C., Newton, M.A. and et al. (1994):** Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Genes Dev*. **8**: 2227-40.
- Rich, J.N., Guo, C., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Wang, X.F. and Counter, C.M. (2001):** A genetically tractable model of human glioma formation. *Cancer Res*. **61**: 3556-60.
- Romanov, S.R., Kozakiewicz, B.K., Holst, C.R., Stampfer, M.R., Haupt, L.M. and Tlsty, T.D. (2001):** Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature*. **409**: 633-7.
- Ruediger, R., Pham, H.T. and Walter, G. (2001):** Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. *Oncogene*. **20**: 10-5.
- Rundell, K. and Parakati, R. (2001):** The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Biol*. **11**: 5-13.
- Sablina, A.A. and Hahn, W.C. (2008):** SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Rev*. **27**: 137-46.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning: a laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santra, M., Eichstetter, I. and Iozzo, R.V. (2000):** An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*. **275**: 35153-61.

- Santra, M., Reed, C.C. and Iozzo, R.V. (2002):** Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem.* **277**: 35671-81.
- Santra, M., Skorski, T., Calabretta, B., Lattime, E.C. and Iozzo, R.V. (1995):** De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 7016-20.
- Schaefer, L., Macakova, K., Raslik, I., Micegova, M., Grone, H.J., Schonherr, E., Robenek, H., Echtermeyer, F.G., Grassel, S., Bruckner, P., Schaefer, R.M., Iozzo, R.V. and Kresse, H. (2002):** Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol.* **160**: 1181-91.
- Schaefer, L., Mihalik, D., Babelova, A., Krzyzankova, M., Grone, H.J., Iozzo, R.V., Young, M.F., Seidler, D.G., Lin, G., Reinhardt, D.P. and Schaefer, R.M. (2004):** Regulation of fibrillin-1 by biglycan and decorin is important for tissue preservation in the kidney during pressure-induced injury. *Am J Pathol.* **165**: 383-96.
- Scheffner, M., Romanczuk, H., Munger, K., Huibregtse, J.M., Mietz, J.A. and Howley, P.M. (1994):** Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* **186**: 83-99.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990):** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63**: 1129-36.
- Scheurer, M.E., Tortolero-Luna, G. and Adler-Storthz, K. (2005):** Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* **15**: 727-46.
- Schinzel, A.C. and Hahn, W.C. (2008):** Oncogenic transformation and experimental models of human cancer. *Front Biosci.* **13**: 71-84.
- Schneider, G. and Schmid, R.M. (2003):** Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer.* **2**: 15.
- Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G. (2007):** Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* **7**: 295-308.
- Seger, Y.R., Garcia-Cao, M., Piccinin, S., Cunsolo, C.L., Doglioni, C., Blasco, M.A., Hannon, G.J. and Maestro, R. (2002):** Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell.* **2**: 401-13.
- Seidler, D.G., Goldoni, S., Agnew, C., Cardi, C., Thakur, M.L., Owens, R.T., McQuillan, D.J. and Iozzo, R.V. (2006):** Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and

- metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem.* **281**: 26408-18.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997):** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* **88**: 593-602.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997):** A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* **33**: 787-91.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (1989):** Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res.* **184**: 109-18.
- Sherr, C.J. and DePinho, R.A. (2000):** Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* **102**: 407-10.
- Short, S.M., Derrien, A., Narsimhan, R.P., Lawler, J., Ingber, D.E. and Zetter, B.R. (2005):** Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol.* **168**: 643-53.
- Steenbergen, R.D., Walboomers, J.M., Meijer, C.J., van der Raaij-Helmer, E.M., Parker, J.N., Chow, L.T., Broker, T.R. and Snijders, P.J. (1996):** Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q. *Oncogene.* **13**: 1249-57.
- Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J. and McCance, D.J. (1993):** The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol.* **67**: 4521-32.
- Streit, M., Stephen, A.E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L.F., Vacanti, J.P. and Detmar, M. (2002):** Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Res.* **62**: 2004-12.
- Tralhao, J.G., Schaefer, L., Micegova, M., Evaristo, C., Schonherr, E., Kayal, S., Veiga-Fernandes, H., Danel, C., Iozzo, R.V., Kresse, H. and Lemarchand, P. (2003):** In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer. *Faseb J.* **17**: 464-6.

- Trotman, L.C., Alimonti, A., Scaglioni, P.P., Koutcher, J.A., Cordon-Cardo, C. and Pandolfi, P.P. (2006):** Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature*. **441**: 523-7.
- Troup, S., Njue, C., Kliewer, E.V., Parisien, M., Roskelley, C., Chakravarti, S., Roughley, P.J., Murphy, L.C. and Watson, P.H. (2003):** Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res*. **9**: 207-14.
- Tuna, M., Chavez-Reyes, A. and Tari, A.M. (2005):** HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. **24**: 1648-52.
- van Elsas, A., Scheibenbogen, C., van der Minne, C., Zerp, S.F., Keilholz, U. and Schrier, P.I. (1997):** UV-induced N-ras mutations are T-cell targets in human melanoma. *Melanoma Res*. **7 Suppl 2**: S107-13.
- Vider, B.Z., Zimmer, A., Chastre, E., Prevot, S., Gespach, C., Estlein, D., Wolloch, Y., Tronick, S.R., Gazit, A. and Yaniv, A. (1996):** Evidence for the involvement of the Wnt 2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene*. **12**: 153-8.
- Vieten, L., Belair, C.D., Savelieva, L., Julicher, K., Brocker, F., Bardenheuer, W., Schutte, J., Opalka, B. and Reznikoff, C.A. (1998):** Minimal deletion of 3p13-->14.2 associated with immortalization of human uroepithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer*. **21**: 39-48.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004):** Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. **10**: 789-99.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000):** Surfing the p53 network. *Nature*. **408**: 307-10.
- Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2003):** The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*. **4**: 311-9.
- Vousden, K.H. and Lu, X. (2002):** Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. **2**: 594-604.
- Wan, F., Miao, X., Quraishi, I., Kennedy, V., Creek, K.E. and Pirisi, L. (2008):** Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: A comparison between an *in vitro* cell model and cervical cancer. *Int J Cancer*. **123**:32-40).
- Wang-Rodriguez, J., Urquidi, V., Rivard, A. and Goodison, S. (2003):** Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res*. **5**: R136-43.

- Wang, S.S., Esplin, E.D., Li, J.L., Huang, L., Gazdar, A., Minna, J. and Evans, G.A. (1998):** Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*. **282**: 284-7.
- Wei, W., Jobling, W.A., Chen, W., Hahn, W.C. and Sedivy, J.M. (2003):** Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. **23**: 2859-70.
- Wei, W. and Sedivy, J.M. (1999):** Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp Cell Res*. **253**: 519-22.
- Weinberg, R.A. (1995):** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. **81**: 323-30.
- Werner, H., Shen-Orr, Z., Rauscher, F.J., 3rd, Morris, J.F., Roberts, C.T., Jr. and LeRoith, D. (1995):** Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with suppression of insulin-like growth factor I receptor gene expression. *Mol Cell Biol*. **15**: 3516-22.
- Wilson, R., Ryan, G.B., Knight, G.L., Laimins, L.A. and Roberts, S. (2007):** The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology*. **362**: 453-60.
- Wright, W.E. and Shay, J.W. (2001):** Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev*. **11**: 98-103.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M. and Ruoslahti, E. (1990):** Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*. **346**: 281-4.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C.M., Nevins, J.R., Means, A.R. and Sears, R. (2004):** A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol*. **6**: 308-18.
- Yin, D., Xie, D., Hofmann, W.K., Miller, C.W., Black, K.L. and Koeffler, H.P. (2002):** Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene*. **21**: 8372-8.
- Yu, J., Boyapati, A. and Rundell, K. (2001):** Critical role for SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Virology*. **290**: 192-8.
- Yuan, T.L. and Cantley, L.C. (2008):** PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. **27**: 5497-510.

- Zhao, C.X., Zhao, Y.T., Wang, P.H., Xiao, X. and Wang, D.W. (2005):** [Influences of recombinant adeno-associated virus-mediated Decorin gene transfection on cell cycle and apoptosis of SiHa cells.]. *Ai Zheng*. **24**: 28-32.
- Zhao, J.J., Gjoerup, O.V., Subramanian, R.R., Cheng, Y., Chen, W., Roberts, T.M. and Hahn, W.C. (2003):** Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell*. **3**: 483-95.
- Zhao, J.J., Roberts, T.M. and Hahn, W.C. (2004):** Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol Med*. **10**: 344-50.
- Zhu, J.X., Goldoni, S., Bix, G., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Reed, C.C. and Iozzo, R.V. (2005):** Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem*. **280**: 32468-79.
- zur Hausen, H. (1996):** Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. **1288**: F55-78.
- zur Hausen, H. (2000):** Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. **92**: 690-8.

8. Publikationen

Heyken, W.T., Repenning, A., Kumme, J. and Schuller, H.J. (2005): Constitutive expression of yeast phospholipid biosynthetic genes by variants of Ino2 activator defective for interaction with Opi1 repressor. *Mol Microbiol.* **56**: 696-707.

Hoppen, J., Repenning, A., Albrecht, A., Geburtig, S. and Schuller, H.J. (2005): Comparative analysis of promoter regions containing binding sites of the heterodimeric transcription factor Ino2/Ino4 involved in yeast phospholipid biosynthesis. *Yeast.* **22**: 601-13.

Poetsch, M., Ludcke, C., Repenning, A., Fischer, L., Malyusz, V., Simeoni, E., Lignitz, E., Oehmichen, M. and von Wurmb-Schwark, N. (2006a): The problem of single parent/child paternity analysis--practical results involving 336 children and 348 unrelated men. *Forensic Sci Int.* **159**: 98-103.

Poetsch, M., Petersmann, H., Repenning, A. and Lignitz, E. (2005): Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. *Forensic Sci Int.* **155**: 71-6.

Poetsch, M., Repenning, A., Lignitz, E., Kuhlich, E. and Szibor, R. (2006b): DXS6797 contains two STRs which can be easily haplotyped in both sexes. *Int J Legal Med.* **120**: 61-6.

von Wurmb-Schwark, N., Malyusz, V., Simeoni, E., Oehmichen, M., Lignitz, E., Ludcke, C., Repenning, A. and Poetsch, M. (2004): [Paternity analysis in deficiency cases with related putative fathers: simulation of a deficiency analysis in 27 families]. *Arch Kriminol.* **214**: 173-83.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag:	01.02.1980
Geburtsort:	Ueckermünde
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Anschrift:	Braunschweiger Str. 15, 45145 Essen

Ausbildung

Juli 1998	Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium Ueckermünde
Okt.1998 - Sept. 2000	Studium der Biologie an der Universität Rostock; Abschluss des Grundstudiums mit dem Vordiplom
Okt. 2000 - Mai 2004	Weiterführung des Studiums der Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Abschluss des Hauptstudiums mit dem Diplom
Febr.- März 2002	Praktikum am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Mai-August 2004	Praktikum am Institut für Rechtsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
seit Nov. 2004	Wissenschaftliche Angestellte und Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „**Etablierung eines *in vitro* Tumorprogressionsmodells für humane epitheliale Zellen durch Einbringen definierter genetischer Elemente**“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Antje Repenning befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. H. Esche)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Antje Repenning)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Antje Repenning)

Danksagung

Zu allererst möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester danken, die wie immer mein Fels in der Brandung waren und ohne deren Liebe, Verständnis, und uneingeschränkter Unterstützung vieles in meinem Leben schwerer oder gar unmöglich gewesen wäre – diese Doktorarbeit eingeschlossen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern, Dr. Kerstin Lowinski und Prof. Helmut Esche für die Initiation und die Ermöglichung der Durchführung dieses Projekts sowie die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Interpretation von Ergebnissen oder der Lösung von Problemen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle meine Kollegen am Institut für Molekularbiologie, die mich durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben, denen ich ein wunderbares Arbeitsklima zu verdanken habe und von denen ich einige auch privat zu schätzen gelernt habe. Dies gilt sowohl für die „Alteingesessenen“ der Arbeitsgruppen Lowinski/Esche und Gulbins als auch für die „Neuzugänge“, die Arbeitsgruppen Palmada/Böhmer und Winterhager. Mein besonderer Dank geht hierbei an Angelika Zaremba, die mit mir über drei Jahre Freud und Leid des Doktorandendaseins geteilt hat, Angela Kehrmann, die mir die „Eingewöhnungsphase“ in der Lowinski-AG sehr erleichtert hat, sowie Ulla Schmücker und Claudine Kühn, die immer ein offenes Ohr für technische (und andere) Probleme hatten.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich allen aussprechen, die außerhalb des Instituts für Molekularbiologie einen Beitrag zum Gelingen dieser Doktorarbeit geleistet haben: Dr. Ulrich Pascheberg und Frau Kinscher von der Laboratoriumsmedizin Dr. Eberhard und Partner in Dortmund für die Hilfe bei den zytogenetischen Untersuchungen; Dr. Martin Tötsch, Frau Kramer und Frau Linker vom Institut für Pathologie und Neuropathologie für die Zusammenarbeit bei den histologischen Färbungen; Frau Dr. Minna Niemela vom Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finnland für die Unterstützung bei der Analyse der CIP2A-Proteinexpression; Dr. Ludger Klein-Hitpaß vom Biochip-Labor des Instituts für Zellbiologie für die Zusammenarbeit bei den Mikroarray- und Real Time RT-PCR-Analysen sowie Frau Hadow vom Zentralen Tierlabor für die Pflege der Versuchstiere.

Bei Prof. Frank Rösl, Prof. Petra Boukamp und Prof. Harald zur Hausen (DKFZ, Heidelberg), Prof. Oliver G. Opitz (Universitätsklinikum Freiburg), Prof. Barret J. Rollins und Prof. William C. Hahn (Dana-Faber-Cancer-Institute, Boston, USA) sowie Prof. Robert A.

Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Boston, USA) möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung verschiedener Zelllinien und Vektoren sowie für die hilfreichen Tipps und Ratschläge zur Lösung diverser technischer Probleme bedanken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Aktion „Kampf dem Krebs“ e.V., der Jürgen Manchot Stiftung, Düsseldorf, der Krupp-von-Bohlen-und-Halbach-Stiftung, Essen, dem Förderverein Tumorforschung e.V., Essen sowie dem Förderverein der Hämatologie Essen e.V. für ihre finanzielle Unterstützung.